

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有權機關
國際事務局



(43) 国際公開日
2001年1月11日(11.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/02564 A1

(51) 國際特許分類7: C12N 15/12, 5/10, C12P 21/02, C07K
14/47, 16/18, A61K 45/00, 38/17, 39/395, 49/16, A61P
19/02, 19/08, A61K 31/7088 // (C12P 21/02, C12R 1:19)

(JP). 野口優子 (NOGUCHI, Yuko) [JP/JP]; 〒 305-0051 茨城県つくば市二の宮4丁目13-12-301 Ibaraki (JP). 吉村浩二 (YOSHIMURA, Koji) [JP/JP]; 〒 305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9-101 Ibaraki (JP). 田中秀幸 (TANAKA, Hideyuki) [JP/JP]; 〒 305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9-1302 Ibaraki (JP).

(21) 國際出願番号: PCT/JP00/04278

(22) 國際出願日: 2000年6月29日(29.06.2000)

(25) 國際出願の言語: 日本語

(26) 國際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/186718 1999年6月30日(30.06.1999) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 伊藤康明 (ITOH, Yasuaki) [JP/JP]; 〒300-0832 茨城県土浦市桜ヶ丘町36番地16 Ibaraki (JP). 西 一紀 (NISHI, Kazunori) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県つくば市並木4丁目16番1-402 Ibaraki (JP). 大儀和宏 (OGI, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒305-0045 茨城県つくば市梅園2丁目16番地1-206号 Ibaraki (JP). 大久保尚一 (OHKUBO, Shoichi) [JP/JP]; 〒300-1234 茨城県牛久市中央1丁目4番地23 Ibaraki (JP). 茂木伸一 (MOGI, Shinichi) [JP/JP]; 〒302-0121 茨城県北相馬郡守谷町みずき野1丁目 17番地16 Ibaraki

(74) 代理人: 弁理士 高橋秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BY, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, RO,
RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU,
ZA.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
一 國際調查報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCT gazetteの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDE AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: 新規ポリペプチドおよびそのDNA

| | | |
|-------|---|----|
| M1LP | H A R I L L L F L P C L V A V C A V H G I P - - - - - M D S L A S E K K L C A D D E C V Y T | 40 |
| M2LP | H A R I L L L F L P C L V A V C A V H G I P - - - - - M D S L A S E K K L C A D D E C V Y T | 40 |
| M3CA | R A R S L V - C L G C V I X I L L B A F S G P C V R D G C P M K P L A D E K L C A D D E C V Y T | 41 |
| M3LA | N V W S P V - L L G C V I V L L L S S V F S G P S R A D R A H P K L A D E K L C A D D E C S H P R | 42 |
| M3CA | C S C P V - L L G C V I V L L L S S V F S G P S R A D R A H P K L A D E K L C A D D E C S H P R | 42 |
| M3LA | N H A R E V - P L G C V I V L L L S S V F S G P S R A D R A H P K L A D E K L C A D D E C S H P R | 43 |
| M4LP | I S L S A S A Q E D Y T H A P D C R F I V N K E G O Q I Y V Y S E R K L V X H G C A G E - F W M A G | 44 |
| M5LP | I S L R A A Q E D Y T H A P D C R F I V N K E G O Q I Y V Y S E R K L V X H G C A G E - F W M A G | 44 |
| M6LA | I S H A V A V Q D Y V A P D C R F P L T I M D G C O V V V V V F S R K L V T - K G R G R G R E F W M G G | 45 |
| M7LA | I S H A V A V Q D Y V A P D C R F P L T I M D G C O V V V V V F S R K L V T - K G R G R G R E F W M G G | 45 |
| M8LA | I S H A V A V Q D Y V A P D C R F P L T I M D G C O V V V V V F S R K L V T - K G R G R G R E F W M G G | 45 |
| M9LA | I S H A V A V Q D Y V A P D C R F P L T I M D G C O V V V V V F S R K L V T - K G R G R G R E F W M G G | 45 |
| M10LP | S V Y T G D G Q D E M - H G V - V G Y P P R N L V I E R O R V Y G E A T E K E P P T D I D V P F C C B | 46 |
| M11LP | S V Y C D H D O D E M - C - V G Y P P S H N L V I E R O R V Y G E A T E K E P P T D I D V P F C C B | 46 |
| M12LA | S V O G D X Y G D L A A R L G Y P P S S B Z V D K P D O T V L R N F G K V D P K T S D K W D P F T C C G | 47 |
| M13LA | S V O G C G Y G D L A A R L G Y P P S S B Z V D K P D O T V L R N F G K V D P K T S D K W D P F T C C G | 47 |
| M14LA | S V O G D Y Y G D G C A R L G Y P P S S B Z V D K P D O T V L R N F G K V D P K T S D K W D P F T C C G | 47 |

(57) Abstract: A novel polypeptide; a DNA encoding the same; drugs containing the polypeptide or DNA; a method of screening a compound promoting or inhibiting the activity of the above polypeptide or its salt; a screening kit therefor; the compound or its salt obtained by this screening; drugs containing the above compound or its salt and the like. The above-described polypeptide and the DNA encoding the same are usable, for example, in diagnosing, treating and

preventing bone and joint diseases and pathologic angiogenesis. The present compound promoting or inhibiting the activity of the polypeptide or its salt.



(57) 要約:

本発明は、新規ポリペプチドおよびそれをコードするDNA、該ポリペプチドもしくはDNAを含有してなる医薬、該ポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法／スクリーニング用キット、該スクリーニングによって得られる化合物またはその塩、該化合物またはその塩を含有してなる医薬などに関する。

本発明のポリペプチドおよびそれをコードするDNAは、例えば、骨・関節疾患、病的血管新生の診断、治療、予防などに使用することができる。また、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

明細書

新規ポリペプチドおよびそのDNA

5 技術分野

本発明は、新規な分泌性細胞機能調節蛋白質およびそのDNAに関する。

背景技術

細胞はその原核性、真核性を問わず、その固有の機構で多種多様な蛋白質を分泌している。特に多細胞生物（生体）は、その分化、増殖および恒常性の維持のためにさまざまな情報を細胞間で交換しているが、そこで中心的役割を果たす各種液性因子もその多くが分泌蛋白質或いはその成熟体であり、その構造的、機能的特徴等からホルモン、神経伝達物質、サイトカイン、増殖因子等に分類されている。近年の組換えDNA技術と細胞培養技術の進歩により、これら分泌蛋白質をコードする遺伝子と蛋白質構造の解明が着実に進んでいる。一方でこうした因子の発見は、細胞表面に発現しているその受容体の解析を飛躍的に前進させ、さらには各細胞内での情報伝達のメカニズム解明にもつながり、その生理機能を特徴づけることになる。ヒトにおける多くの疾病、あるいは各種疾患モデル動物の病態では、こうした本来恒常性を保つべき何らかの液性因子の異常な発現がその原因となったり、結果として増悪化につながる場合も多く見出される他、例えば癌において特異的に発現の亢進が認められるいわゆる腫瘍マーカー等、各種疾患の診断分野で応用可能な現象もあり、その発現制御機構は創薬研究を行う上で重要な標的にもなっている。

1994年に Blesch らが発表した黒色腫阻害蛋白質 MIA (melanoma inhibitory activity) もそうした範疇に含まれる分泌蛋白質の一種で、当初、その名が示す通りヒト黒色腫細胞に対する抗増殖活性を指標に黒色腫細胞の培養上清から単離され、その遺伝子も取得された(Cancer Research) 54, 5695-5701, 1994)。その後 1996 年 Sandell らによって本蛋白質

の相同遺伝子が、ウシ軟骨細胞が產生するレチノイン酸感受性蛋白質 CD-RAP (cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein)として再び同定され、生理学的には関節の形成・維持に機能することが示唆されている（ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry) 271, 3311-3316, 1996）。MIA/CD-RAP 遺伝子はヒト、マウス、ラット、ウシの種間でアミノ酸レベルで 85% 以上の高い相同意を有しているものの、これまでに公知の蛋白質で相同意のあるものは見つかっておらず、またウシ、ラットにおける遺伝的解析から、本遺伝子の類似遺伝子は他に存在しないと考えられていた（ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry) 271, 3311-3316, 1996）。

一方、現在、一つの生物のもつ全 DNA、つまりゲノムの構造解析が、バクテリアでは既にいくつか終わり、ヒトのそれも数年で完成の見通しが立っているが、その予想される遺伝子数はヒトにおいては十万とも言われている。確かにこれまで数多くの分泌蛋白質或いは分泌ペプチドをコードする遺伝子が単離されてきているものの、その数は全ゲノムからみればとてもそのすべてを網羅したとはいえない。個体レベルの生命現象を理解する上でその中で起こっているあらゆる細胞間の情報交換が説明可能になっていかなければならぬが、こうした既知の遺伝子以外にも未だ知られていない液性の機能分子が重要な生理的役割を果たしている可能性が高く、そうした物質の発見が強く望まれていた。

本発明は新規細胞機能調節分泌蛋白質（以下 MLP 蛋白質または MLP と称する場合がある）、その部分ペプチドまたはその塩、該タンパク質をコードする DNA、組換えベクター、形質転換体、該タンパク質の製造法、該タンパク質または DNA を含有する医薬、該タンパク質に対する抗体、レセプターアゴニスト／アンタゴニストのスクリーニング方法並びにスクリーニング用キット、該スクリーニングで得られるレセプターアゴニスト／アンタゴニスト並びにその医薬等を提供することを目的とする。

新たな細胞機能調節分泌蛋白質の単離は、細胞の分化、増殖、癌化等のメカニズムに新たな知見を与え、ひいては個体の発生、恒常性の維持等の生命現象

の解明をより一層進展させることができ、該蛋白質に対して阻害活性或いは促進活性を発揮し、種々の疾患の予防や診断、治療に役立つ新たな医薬品の開発ができる。

5 発明の開示

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト胎児脳、マウス胎児由来 cDNA ライブラリーからそれぞれ新規な塩基配列を有する cDNA をクローニングすることに成功した。そして、本発明者らは、得られた cDNA にコードされる蛋白質が有用な細胞機能調節活性を有する MIA/CD-RAP 様蛋白質 MLP の前駆体蛋白質であり、MLP 前駆体からシグナル配列が切断されて生成する MLP が分泌蛋白質であることを見出した。これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- (1) 配列番号：24で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩、
- (2) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする前記(1)記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩、
- (3) 配列番号：24で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：26で表されるアミノ酸配列である前記(1)記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩、
- (4) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：12で表されるアミノ酸配列である前記(2)記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩、
- (5) 配列番号：24で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：49で表されるアミノ酸配列である前記(1)記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩、

(6) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、
配列番号：47で表されるアミノ酸配列である前記（2）記載のポリペプチド、
そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩、

5 (7) 前記（1）記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを
含有するDNA、

(8) 前記（1）記載のポリペプチドをコードする塩基配列が配列番号：23
で表される塩基配列である前記（6）記載のDNA、

(9) 前記（1）記載のポリペプチドをコードする塩基配列が配列番号：4で
表される塩基配列である前記（6）記載のDNA、

10 (10) 前記（1）記載のポリペプチドをコードする塩基配列が配列番号：2
5で表される塩基配列である前記（6）記載のDNA、

(11) 前記（1）記載のポリペプチドをコードする塩基配列が配列番号：1
0で表される塩基配列である前記（6）記載のDNA、

15 (12) 前記（1）記載のポリペプチドをコードする塩基配列が配列番号：4
8で表される塩基配列である前記（6）記載のDNA、

(13) 前記（1）記載のポリペプチドをコードする塩基配列が配列番号：4
6で表される塩基配列である前記（6）記載のDNA、

(14) 前記（6）記載のDNAを含有する組換えベクター、

(15) 前記（14）記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

20 (16) 前記（15）記載の形質転換体を培養し、該ポリペプチドを生成せし
めることを特徴とする前記（1）記載のポリペプチド、そのアミド、もしくは
そのエステルまたはその塩の製造法、

(17) 前記（1）記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステル
またはその塩に対する抗体、

25 (18) 前記（1）記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステル
またはその塩を用いることを特徴とする前記（1）記載のポリペプチドまたは
その塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(19) 前記（1）記載のポリペプチドまたはその塩を含有してなる前記（1）

記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

5 (20) 前記(18)記載のスクリーニング方法または前記(19)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、前記(1)記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

10 (21) 前記(18)記載のスクリーニング方法または前記(19)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる前記(1)記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(22) 前記(1)記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、

(23) 前記(1)記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる骨・関節疾患または病的血管新生の予防・治療剤、

15 (24) 前記(17)記載の抗体を含有してなる診断剤などに関する。

さらには、本発明は、

(25) 配列番号：24で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：24で表されるアミノ酸配列と約50%以上（好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上）の相同性を有するアミノ酸配列である上記(1)記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩、

20 (26) 配列番号：24で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、①配列番号：24で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：24で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～40個程度、より好ましくは1～30個程度）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：24で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、

1～30個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列である上記(1)記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩等を提供する。

さらに本発明のDNA、およびポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩等は、分子量マーカー、組織マーカー、染色体マッピング、遺伝病の同定、プライマー、プローブの設計等の基礎研究に利用できる可能性がある。

図面の簡単な説明

10 図1はヒトMLP前駆体(hMLP)、マウスMLP前駆体(mMLP)、ヒトMIA前駆体(hMIA)、マウスマIA前駆体(mMIA)、ラットMIA前駆体(rMIA)およびウシMIA前駆体(bMIA)のアミノ酸配列を示す。

図2は実施例6で行われたウエスタンプロット解析の結果を示す。一次抗体として抗FLAG抗体を用いた。

15 図中、レーン1はマウスMLP(FLAGタグなし)、レーン2はマウスMLP-FLAG、レーン3はマウスマIA(FLAGタグなし)、レーン4はマウスマIA-FLAG、レーン5はヒトMLP(FLAGタグなし)、レーン6はマウスMLP-FLAGをそれぞれ導入したCOS-7細胞の培養上清を電気泳動したレーンを示す。

20 図3は実施例6で行われたウエスタンプロット解析の結果を示す。一次抗体として抗MLP抗血清を用いた。

図中、レーン1はマウスMLP(FLAGタグなし)、レーン2はマウスMLP-FLAG、レーン3はマウスマIA(FLAGタグなし)、レーン4はマウスマIA-FLAG、レーン5はヒトMLP(FLAGタグなし)、レーン6はマウスMLP-FLAGをそれぞれ導入したCOS-7細胞の培養上清を電気泳動したレーンを示す。

図4は実施例6で行われた免疫染色の結果を示す。左のパネルは免疫前ウサギ血清を用いた対照実験の結果を示し、右のパネルは抗MLP抗血清を用いた

実験の結果を示す。

発明の実施をするための最良の形態

本発明の配列番号: 2 4 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド(以下、ヒト型ポリペプチドと称することがある)、配列番号: 2 6 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド(以下、マウス型ポリペプチドと称することがある)、配列番号: 4 9 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド(以下、ラット型ポリペプチドと称することがある)およびヒト型ポリペプチドと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド(以下、ヒト型ポリペプチドおよびヒト型ポリペプチドと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを総称して本発明のポリペプチドと称することもある)は、ヒトや温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等)の細胞(例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、臍臓 β 細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、纖維芽細胞、纖維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞等)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脑皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、臍臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、唾液腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巢、胎盤、子宮、骨、軟骨、関節、骨格筋等に由来するポリペプチドであってもよく、組換えポリペプチドであってもよく、合成ポリペプチドであってもよい。

また、本発明のポリペプチドがシグナルペプチドを有している場合は、ポリペプチドを効率よく細胞外に分泌させることができる。

配列番号：24で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：24で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列等が挙げられ、具体的には、配列番号：26で表されるアミノ酸配列または配列番号：49で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

配列番号：24で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをヒトMLPまたはヒトMLP蛋白質と、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをマウスMLPまたはマウスMLP蛋白質と、配列番号：49で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをラットMLPまたはラットMLP蛋白質と称することがあり、これらをMLPと総称することがある。

配列番号：24で表されるアミノ酸配列またはそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとして具体的には、例えば、配列番号：6で表されるアミノ酸配列またはそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド等があげられる。

配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：6で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列等が挙げられ、具体的には、配列番号：12で表されるアミノ酸配列または配列番号：47で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをヒトMLP前駆体またはヒトMLP前駆体蛋白質と、配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをマウスMLP前駆体またはマウスMLP前駆体蛋白質と、配列番号：47で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをラットMLP前駆体またはラットMLP前駆体と称することがあり、これらをMLP前駆体と総称することがある。

本発明の配列番号：24で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸

配列を有するポリペプチドとしては、例えば、前記の配列番号：24で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：24で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同質の性質を有するポリペプチド等が好ましい。

5 また、配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドとしては、例えば、前記の配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同質の性質を有するポリペプチド等が好ましい。

10 実質的に同質の性質としては、例えば、分泌され液性因子として作用すること等が挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が定性的に同質であることを示す。したがって、分泌作用や溶解度等の性質が同等（例、約0.1～100倍、好ましくは約0.5～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの性質の程度、ポリペプチドの分子量等の量的要素
15 は異なっていてもよい。

また、配列番号：24または配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとしてより具体的には、例えば、
①配列番号：24または配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：24または配列番号：6で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは1～40個程度、より好ましくは、1～30個程度、さらに好ましくは1～10個程度、なかでも好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：24または配列番号：6で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：24または配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程

度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するポリペプチド等のいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されないが、配列番号：24、配列番号：26および配列番号：49のそれぞれの配列番号で表されるアミノ酸配列に共通するアミノ酸配列以外の位置、配列番号：6、配列番号：12および配列番号：47のそれぞれの配列番号で表されるアミノ酸配列に共通するアミノ酸配列以外の位置等が挙げられる。

本明細書におけるポリペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：24で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをはじめとする、本発明のポリペプチドは、C末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO⁻）であるが、C末端がアミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチル等のC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシル等のC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチル等のC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチル等のフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくはα-ナフチルメチル等のα-ナフチル-C₁₋₂アルキル基等のC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基等が用いられる。

本発明のポリペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステル等が用いられる。

さらに、本発明のポリペプチドには、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基等のC₁₋₆ア

ルカノイル等のC₁₋₆アシル基等)で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基等)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、
5 アセチル基等のC₁₋₆アルカノイル基等のC₁₋₆アシル基等)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ポリペプチド等の複合ポリペプチド等も含まれる。

本発明のポリペプチドまたはその塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸)や塩基(例、アルカリ金属塩)等との塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔥酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩等が用いられる。

15 本発明のポリペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のポリペプチド(タンパク質)の精製方法によって製造することもできるし、後述するポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

20 ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸等で抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のポリペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常
25 市販のポリペプチド(タンパク質)合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシ

メチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂等を挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミド等が用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOEt、HOOEt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOEtエステルあるいはHOOEtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド（タンパク質）縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン等の酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノール等のアルコール類、ジメチルスルホキシド等のスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフラン等のエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類あるいはこれらの適宜の混合物等が用いられる。反応温度はポリペプチド（タンパク質）結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用い

られる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソポルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフイノチオイル、Fmoc等が用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチル等の直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化等によって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基等の低級(C_{1-6})アルカノイル基、ベンゾイル基等のアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等の炭酸から誘導される基等が用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基等である。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチル等が用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、

Trt、Fmoc等が用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシタルイミド、HOBT）とのエステル〕等が用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素等の触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタシスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液等による酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジン等による塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元等も用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約20～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオール等のようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオール等の存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニア等によるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化等は公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

ポリペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖の

N末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法に5よりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチドのアミド体を得ることができる。

ポリペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、10ポリペプチドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明のポリペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従つて製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

- ①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- ②SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- ④矢島治明 および榎原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、25 (1977年)
- ⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶等を組み合わせて本発明のポリペ

プチドポリペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適當な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

5 本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明のポリペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、前記した細胞・組織由来のcDNA、合成DNAのいずれでもよい。

10 ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミド等いずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

15 本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2 3 で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2 3 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質（例、免疫原性等）を有するポリペプチドをコードするDNA等を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質を有するポリペプチドをコードするDNAであれば何れのものでもよい。

20 配列番号：2 3 で表される塩基配列を含有するDNAとしては、配列番号：4 で表される塩基配列を含有するDNA等が用いられる。

25 配列番号：2 3 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2 3 で表される塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNA等が用いられる。

また、配列番号：2 3 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとして、具体的には、配列番号：2 5 で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2 5 で表される塩基配列とハ

イストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質（例、免疫原性等）有するポリペプチドをコードするDNA等を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質を有するポリペプチドをコードするDNA等があげられる。

5 配列番号：25で表される塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：25で表される塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNA等が用いられ、具体的には、配列番号：10で表される塩基配列を含有するDNA等が用いられる。

10 さらに、配列番号：23で表される塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズできるDNAとして、具体的には、配列番号：48で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：48で表される塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質（例、免疫原性等）有するポリペプチドをコードするDNA等を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質を有するポリペプチドをコードするDNA等があげられる。

15 配列番号：48で表される塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：48で表される塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNA等が用いられ、具体的には、配列番号：41または配列番号：46で表される塩基配列を含有するDNA等が用いられる。

20 ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等に従って行なうことができる。また、市販のライプラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジエントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジエントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40 mM、好ましくは約19～20mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。

配列番号：24で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：23で表される塩基配列を有するDNA等が、配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：4で表される塩基配列を有するDNA等が、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：25で表される塩基配列を有するDNA等が、配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：10で表される塩基配列を有するDNA等が、配列番号：49で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：48で表される塩基配列を有するDNA等が、配列番号：47で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：46で表される塩基配列を有するDNA等が用いられる。

本発明のポリペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等に従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、MutanTM-G (宝酒造(株))、MutanTM-K (宝酒造(株)) 等を用いて、Gapped duplex法やKunkel

法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用する
5 ことができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適當な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のポリペプ
10 チドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA
DNA断片を適當な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製
造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR3
15 25, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB11
0, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH
15)、 λ ファージ等のバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウ
イルス、バキュロウイルス等の動物ウイルス等の他、pA1-11、pXT1、
pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo等が用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対
20 応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞
を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、L
TRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーター、 β -アク
チン等が挙げられる。

これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SR α プロ
25 モーター等を用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、t
rpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモ
ーター、lppプロモーター、T7プロモーター等が、宿主がバチルス属菌で
ある場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモ

ーター等、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター等が好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーター等が好ましい。

5 発現ベクターには、以上その他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）等を含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、Geneticin耐性）等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、組換え体細胞をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

10 15 また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列等が、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列等が、宿主が酵母である場合は、MFα・シグナル配列、SUC2・シグナル配列等、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列等がそれぞれ利用できる。

20 25 このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞等が用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）K12・DH1〔プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーワスエー（Proc. Natl.

Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [スクイレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] 等が用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] 等が用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM71等が用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、Mamestra brassicae由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞等が用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞) 等が用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J. L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) 等が用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫等が用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニ

ーズハムスター細胞CHO(以下、CHO(dhfr⁻)細胞と略記)、マウスL細胞、マウスA_tT-20、マウスマイエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞等が用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン(Gene), 17巻, 107(1982)等に記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス(Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)等に記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)等に記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー(Bio/Technology), 6, 47-55(1988)等に記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール, 263-267(1995)(秀潤社発行)、ヴィロロジー(Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、ポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖等、窒素源

としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカーやペプトン、カゼイン、酵母エキス、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液等の無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム等が挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子等を添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー(Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 3β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー(Burkholder)最小培地[Bostian, K. L. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーニティスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)]や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地[Bitter, G. A. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーニティスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)]が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー(Nature), 195, 788(1962))

に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたもの等が用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27°Cで約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス(Science), 122巻, 501(1952)〕、DMEM培地〔ヴィロロジー(Virology), 8巻, 396(1959)〕、RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)〕、199培地〔プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)〕等が用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30~40°Cで約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞外または細胞内に本発明のポリペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解等によって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法等が適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジン等の蛋白質変性剤や、トリトンX-100TM等の界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集め。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法等の溶解度を利

用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法等の主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー等の荷電の差を利用する方法、アフィニティーコロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法等の等電点の差を利用する方法等が用いられる。

かくして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素または蛋白分解酵素等を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。これらの酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼ等が用いられる。

かくして生成する本発明のポリペプチドまたはその塩の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンプロット解析等により測定することができる。

本発明のポリペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のポリペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のポリペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のポリペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

25 [モノクローナル抗体の作製]

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のポリペプチドまたはその塩は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に

際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュvantや不完全フロイントアジュvantを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、
5 マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー(Nature)、256、495(1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルス等が挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。
10
15

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1等の温血動物の骨髄腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1：
20 1～20：1程度であり、PEG(好ましくはPEG1000～PEG6000)が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ポリペプチド抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素等で標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロ
25

テインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素等で標識したポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法等が挙げられる。

5 モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、約1～20%、好ましくは約10～20%の牛胎児血清を含む
10 RPMI 1640培地、約1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））等を用いることができる。培養温度は、通常約20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイ
15 ブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、
20 イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインG等の活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

[ポリクローナル抗体の作製]

25 本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（ポリペプチド抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のポリ

ペプチドまたはその塩に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、

5 キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水等、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明のポリペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと称することもある）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAとしては、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列ある

いは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列等が挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のポリペプチドのN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列等）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置等を用いて製造することができる。

本発明のポリペプチドがシグナルペプチドを有する場合は、細胞外に効率よく分泌され、液性因子として、シグナル伝達や自己防衛等のための重要な生物活性を發揮する。

以下に、本発明のポリペプチドまたはその塩（以下、本発明のポリペプチドと略記する場合がある）、本発明のポリペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のポリペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、およびアンチセンスDNAの用途を説明する。

（1）本発明のポリペプチドは、軟骨組織特異的に発現しているため、組織マーカーとして使用することができる。すなわち組織の分化、病態、癌の転移等の検出のためのマーカーとして有用である。また、対応するレセプター、リガンド、結合ポリペプチド等の分取にも利用できる。さらに、自体公知のハイスクループットスクリーニングのためのパネルにして、生物活性を調べるのに利用できる。また、染色体マッピングを行い、遺伝病の研究にも利用できる。

（2）本発明のポリペプチドが関与する各種疾病的治療・予防剤

本発明のポリペプチドは、生体内（特に軟骨組織）で液性因子として存在し、軟骨分化を抑制する機能を有するため、本発明のポリペプチド、または本発明のDNA等に異常があつたり、欠損している場合あるいは発現量が異常に減少または亢進している場合、種々の疾病が発症する。

発明のDNA等が欠損している場合あるいは発現量が異常に減少している場

合、例えば、変形性関節症、慢性関節リウマチ、大理石病等の骨・関節疾患、病的血管新生等、種々の疾病が発症する。

したがって、本発明のポリペプチドおよび本発明のDNAは、例えば変形性関節症、慢性関節リウマチ、大理石病等の骨・関節疾患、病的血管新生等、種々の疾病的治療・予防剤等の医薬として使用することができる。
5

例えば、生体内において本発明のポリペプチドが減少あるいは欠損しているために、細胞における情報伝達が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、(イ) 本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のポリペプチドを発現させることによって、(ロ) 細胞に本発明のDNAを挿入し、
10 本発明のポリペプチドを発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ) 本発明のポリペプチドを該患者に投与すること等によって、該患者における本発明のポリペプチドの役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクター等の適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのまで、あるいは摂取促進のための補助剤等の生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子錠やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。
20

本発明のポリペプチドを上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のポリペプチドは、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤等として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤等の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のポリペプチドを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤等と

ともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤等に混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターク、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターク、ゼラチン、アルギン酸等のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤等が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油等のような天然産出植物油等を溶解または懸濁させる等の通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウム等）等が挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール等）、ポリアルコール（例えば、プロピレンジリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80TM、HCO-50 等）等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等と併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液等）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン等）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール等）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノール等）、酸化防止剤等と配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトま

たは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル等）に対して投与することができる。

本発明のポリペプチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルート等により差異はあるが、例えば、骨・関節疾患の治療目的で本発明のポリペプチドを
5 経口投与する場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき本発明のポリペプチドを約1 mg～1000 mg、好ましくは約10～500 mg、より好ましくは約10～200 mg投与する。非経口的に投与する場合は、本発明のポリペプチドの1回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、例えば、骨・関節疾患の治療目的で本発明のポリペプチドを注射剤の
10 形で成人（体重60 kgとして）に投与する場合、一日につき該ポリペプチドを約1～1000 mg程度、好ましくは約1～200 mg程度、より好ましくは約10～100 mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。
15

（2）疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のポリペプチドは生体内（特に軟骨組織等）で液性因子として存在し、軟骨分化を抑制する機能を有するため、本発明のポリペプチドの機能を促進する化合物またはその塩は、例えば、変形性関節症、慢性関節リウマチ、大理石病等の骨・関節疾患、病的血管新生等の治療・予防剤等の医薬として使用できる。
20

一方、本発明のポリペプチドの機能を阻害する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの產生過剰に起因する疾患、例えば、変形性関節症、慢性関節リウマチ、骨形成不全症、骨粗鬆症、骨折、大腿骨頭壊死症、軟骨形成不全症等の骨・関節疾患、病的血管新生等の治療・予防剤等の医薬として使用できる。
25

したがって、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、

(1) 本発明のポリペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその塩の機能を促進する化合物もしくはその塩（以下、促進剤と略記する場合がある）、または本発明のポリペプチドまたはその塩の機能を阻害する化合物（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明のポリペプチドまたはその塩を含有するものである。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿等から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの機能を促進または阻害する化合物である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤等とすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル等）に対して経口的または非経口的に投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルート等により差異はあるが、例えば、骨・関節疾患治療の目的で本発明のポリペプチドの機能を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60 kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ま

しくは約1.0～5.0mg、より好ましくは約1.0～2.0mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、例えば、骨・関節疾患治療の目的で本発明のポリペプチドの機能を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～3.0mg程度、好ましくは約0.1～2.0mg程度、より好ましくは約0.1～1.0mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

一方、本発明のポリペプチドの機能を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～1.00mg、好ましくは約1.0～5.0mg、より好ましくは約1.0～2.0mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、本発明のポリペプチドの機能を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～3.0mg程度、好ましくは約0.1～2.0mg程度、より好ましくは約0.1～1.0mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

（3）本発明のポリペプチドまたはその塩の定量

本発明のポリペプチドに対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のポリペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量等に使用することができる。

すなわち、本発明は、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のポリペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のポリペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドの定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドの定量法を提供する。

5 また、本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のポリペプチドの定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')₁、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。

10 本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、本発明のポリペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質等が用いられる。放射性同位元素としては、
20 例えば、[¹²⁵I]、[¹³¹I]、[³H]、[¹⁴C] 等が用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート等が用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニン等が用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビシン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化にあたっては、物理吸着を用いてもよく、また通

常ポリペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロース等の不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

5 サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のポリペプチド量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時にあってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のポリペプチドの測定法においては、
15 1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のポリペプチドの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のポリペプチドのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

20 本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリー等に用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（F）と、抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B／F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B／F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体等を用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの
5 相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリー等が好適に用いられる。

10 これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のポリペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書等を参照することができる。

15 例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」
20 Vol. 70(Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical
25 Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、アカデミックプレス社発行）等を参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のポリペプチドを感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のポリペプチドの濃度を定量することによって、(1)本発明のポリペプチドの濃度の增多が検出された場合、例えば、骨・関節疾患（例えば、変形性関節症、慢性関節リウマチ、骨形成不全症、骨粗鬆症、骨折、大腿骨頭壊死症、軟骨形成不全症等）、病的血管新生（例えば、腫瘍血管新生等）の疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、(2)本発明のポリペプチドの濃度の減少が検出された場合、例えば、骨・関節疾患（例えば、変形性関節症、慢性関節リウマチ、大理石病、等）、病的血管新生（例えば、腫瘍血管新生等）の疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織等の被検体中に存在する本発明のポリペプチドを検出するために使用することができる。また、本発明のポリペプチドを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のポリペプチドの検出、被検細胞内における本発明のポリペプチドの挙動の分析等のために使用することができる。

15 (4) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル等）における本発明のポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができる
20 ので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多等の遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics）,
25 第5巻, 874~879頁（1989年）、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユースエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻, 2766~2770頁（1989年））、DNAマイクロアレイ等

により実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションやDNAマイクロアレイにより発現低下が検出された場合やPCR-SSCP法やDNAマイクロアレイによりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、骨・関節疾患（例えば、変形性関節症、慢性関節リウマチ、大理石病、等）、病的血管新生（例えば、腫瘍血管新生等）の疾病である可能性が高いと診断することができる。
5

（5）アンチセンスDNAを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、生体内における本発明のポリペプチドまたは本発明のDNAの機能を抑制することができるので、例えば、本発明のポリペプチドの発現過多に起因する疾患（例えば、変形性関節症、慢性関節リウマチ、骨形成不全症、骨粗鬆症、骨折、大腿骨頭壊死症、軟骨形成不全症等の骨・関節疾患、腫瘍血管新生等の病的血管新生）の治療・予防剤として使用することができる。
10

上記アンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として、前記した本発明のDNAを含有する各種疾病的治療・予防剤と同様に使用することができる。
15

例えば、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクター等の適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って投与することができる。該アンチセンスDNAは、そのまで、あるいは摂取促進のために補助剤等の生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。
20

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるために診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

25 （6）本発明の抗体を含有する医薬

本発明のポリペプチドの活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、本発明のポリペプチドの発現過多に起因する疾患（例えば、変形性関節症、慢性関節リウマチ、骨形成不全症、骨粗鬆症、骨折、大腿骨頭壊死症、軟骨形

成不全症等の骨・関節疾患、腫瘍血管新生等の病的血管新生) の治療・予防剤等の医薬として使用することができる。

本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物(例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル等)に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルート等によっても異なるが、例えば、骨・関節疾患治療の目的で本発明の抗体を1回量として、通常 $0.01\sim20\text{mg}/\text{kg}$ 体重程度、好ましくは $0.1\sim10\text{mg}/\text{kg}$ 体重程度、さらに好ましくは $0.1\sim5\text{mg}/\text{kg}$ 体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて增量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等があげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぶん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウム等が用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、

懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、
5 ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の
10 坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤等が例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500 mg 程度、とりわけ注射剤では
15 5～100 mg 程度、その他の剤形では 10～250 mg 程度の上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

(7) DNA 転移動物

本発明は、外来性の本発明のポリペプチドをコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。
20 すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- 25 (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、
- (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および
- (4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞等に対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法等により目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞等に目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養等に利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラット等が用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統等、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統等）またはラット（例えば、Wistar, SD等）等が好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒト等が挙げられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異等）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換等が生じたDNA等が用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のポリペプチドを発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のポリペプチドの機能を抑制するポリペプチド

を発現させるDNA等が用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同意識が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス等）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクター等）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、入ファージ等のバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルス等のレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルス等の動物ウィルス等が用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミド等が好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルス等）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス等）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランسفエラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1, K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリ fosfotransferase、

心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie-2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na₊K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミンβ-水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）、βアクチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋αアクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシン等のプロモーター等が用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）のプロモーター、ヒトおよびニワトリβアクチンプロモーター等が好適である。

上記ベクターは、DNA転写哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウィルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウィルスのSV40ターミネーター等が用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部等をプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

該翻訳領域は転写動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動

物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

5 本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

15 導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能亢進症や、本発明のポリペプチドが関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

25 また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドに関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外

来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。
5 受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その
10 胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

20 また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症における本発明の異常ポリペプチドによる正常ポリペプチドの機能阻害 (dominant negative作用) を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物の他の利用可能性として、例えば、

①組織培養のための細胞源としての使用、
②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、
またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発
明のポリペプチドにより特異的に発現あるいは活性化するポリペプチドとの関
連性についての解析、
③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用
して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
10 ⑤本発明の変異ポリペプチドを単離精製およびその抗体作製等が考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症等を含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のポリペプチドに関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、
15 該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシン等のポリペプチド（タンパク質）分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のポリペプチド産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べること等ができる、本発明のポリペプチドおよびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症を含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法等を用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のポリペプチドが関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

(8) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- 5 (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
(2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、
(3) ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、
(4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）項記載の胚幹細胞、
10 (5) ゲッ歯動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、
(6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
(7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
15 (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
(9) ゲッ歯動物がマウスである第（8）項記載の非ヒト哺乳動物、および
(10) 第（7）項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
20

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人为的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のポリペプチドの活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のポリペプチドの発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人为的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学

的手法により該DNA配列の一部または全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

5 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（β-ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナル等）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するよう構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活性化する元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得する等の目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したB

D F₁ マウス (C 5 7 B L / 6 と D B A / 2 との F₁) を用いて樹立したもの等も良好に用いられる。B D F₁ マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C 5 7 B L / 6 マウスを背景に持つので、これを用いて得られた E S 細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C 5 7 B L / 6 マウスと戻し交配 (バッククロス) することでその遺伝的背景を C 5 7 B L / 6 マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、E S 細胞を樹立する場合、一般には受精後 3.5 日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に 8 細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれの E S 細胞を用いてもよいが、通常雄の E S 細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

E S 細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、P C R 法により Y 染色体上の性決定領域の遺伝子を增幅、検出する方法が、その 1 例として挙げることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 1 0⁶ 個の細胞数を要していたのに対して、1 コロニー程度の E S 細胞数 (約 50 個) で済むので、培養初期における E S 細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バニティング法による染色体数の確認等により行なうことができる。得られる E S 細胞の染色体数は正常数の 1 0 0 % が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、E S 細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞 (例えば、マウスでは染色体数が 2 n = 4 0 である細胞) に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、S T O 細胞や纖維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上で L I F (1 - 1 0 0 0 0 U/ml) 存在下に炭酸ガス培養器内 (好ましくは、約 5 % 炭酸ガス、約

95%空気または約5%酸素、約5%炭酸ガス、約90%空気)で約37℃で培養する等の方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液(通常約0.001-0.5%トリプシン/約0.1-5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/約1mM EDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法等がとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋等の種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. EvansおよびM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシードィングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーワースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のポリペプチドの細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAに入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその

近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体であり、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のポリペプチドのホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活性化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活性化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザ

イゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活性化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

5 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のポリペプチドにより誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のポリペプチドの生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病的
10 原因究明および治療法の検討に有用である。

(8 a) 本発明のDNAの欠損や損傷等に起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷等に起因する疾病（骨・関節疾患（例えば、変形性関節症、慢性関節リウマチ大理石病、等）、病的血管新生（例えば、腫瘍血管新生）等）に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。
15

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷等に起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物または
20 その塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが挙げられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿等
25 が挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状等の変化

を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射等が用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質等にあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質等にあわせて適宜選択することができる。
5

例えば、腫瘍血管新生に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に癌細胞移植を行ない、癌細胞移植前または移植後に試験化合物を投与し、該動物の腫瘍マーカー値および腫瘍塊サイズ等を経時的に測定する。

10 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの欠損や損傷等によって引き起こされる疾患（骨・関節疾患（例えば、変形性関節症、慢性関節リウマチ大理石病、等）、病的血管新生（例えば、腫瘍血管新生）等）に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤等の医薬
15 として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例アルカリ金属）等との塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩
20 が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオニ酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔥酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩等が用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、

ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル等)に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルート等により差異はあるが、例えば、骨・関節疾患治療目的で該化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、例えば、骨・関節疾患の治療目的で該化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(8b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

15 本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるもののが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものが挙げられる。

25 レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)、可溶性アルカリフェオスマターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子等が好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非

ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lac Z) で置換している場合、本来、本発明のポリペプチドの発現する組織で、本発明のポリペプチドの代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド (X-gal) のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のポリペプチドの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のポリペプチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒド等で固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-gal を含む染色液で、室温または37°C付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS 溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lac Z をコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸）や塩基（例、有機酸）等との塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、亜酸、安息香酸、メタニスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩等が用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を促進し、該ポリペプチドの機能を促進すること

ができるので、例えば、骨・関節疾患（例えば、変形性関節症、慢性関節リウマチ大理石病、等）、病的血管新生（例えば、腫瘍血管新生）等の疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤等の医薬として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様
5 に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドまたはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル等）に対して投与することができる。
10

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルート等により差異はあるが、例えば、骨・関節疾患の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重
15 60 kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。

非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、例えば、骨・関節疾患の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。
20

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60 kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、本発明のDNA
25

に対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

さらに、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子は、マウスやヒトにおいて、特に軟骨組織で極めて大量に発現していることから、該遺伝子のプロモーター配列は、目的タンパク質（任意の有用遺伝子産物等）を非ヒト温血動物の軟骨組織で大量に発現させるためのプロモーターとして好都合である。非ヒト温血動物としては、例えば上述の温血動物として例示したものと同様のもの等があげられる。

すなわち、本発明は、配列番号：6、配列番号：12または配列番号：47で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドをコードする遺伝子のプロモーター領域の下流（3'末端側）に目的タンパク質（任意の有用遺伝子産物等）を連結し、非ヒト動物に導入することによる目的タンパク質（任意の有用遺伝子産物等）を非ヒト温血動物の軟骨組織優位に発現させる方法を提供する。

該目的タンパク質（任意の有用遺伝子産物等）としては、例えば、サイトカイン（例、インターロイキン、インターフェロン、ケモカイン、造血因子）、増殖因子（例、EGF (epidermal growth factor) またはそれと実質的に同一の活性を有する物質（例えば、EGF、ハレグリン(HER2リガンド)等）、インシュリンまたはそれと実質的に同一の活性を有する物質（例えば、インシュリン、IGF (insulin-like growth factor) -1、IGF-2等）、FGF (fibroblast growth factor) またはそれと実質的に同一の活性を有するもの（例えば、aFGF、bFGF、

KGF(Keratindcyte Growth Factor)、HGF(Hepatocyte Growth Factor)、FGF-10等)、その他の細胞増殖因子(例えば、CSF (colony stimulating factor)、EP0(erythropoietin)、IL-2 (interleukin-2)、NGF(nerve growth factor)、PDGF (platelet-derived growth factor)、TGF β (transforming growth factor β)等)、ホルモン(例、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LH-RH)、成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン(GH-RH)、プロラクチン、メラノサイト刺激ホルモン、甲状腺ホルモン放出ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、黄体ホルモン、卵胞刺激ホルモン、ガストリン、モチリン、ソマトスタチン、セクレチン、グルカゴン、PACAP、VIP等、消化酵素(例、アミラーゼ、ペプシノーゲン、リパーゼ等)、病原体に対する抗体(例、病原性サルモネラ菌等の病原性細菌に対する抗体、インフルエンザ等の病原性ウイルスに対する抗体、エキノコックス等の寄生虫に対する抗体等)、抗菌ポリペプチド(例、セクロピン、ヒスタチン、インドリシジン、プロテグリン、ディフェンシン、リゾチーム等)等の有用遺伝子産物等があげられる。

15 上記の目的タンパク質のうち、

- ① サイトカインを軟骨特異的に発現させることによって、例えば、非ヒト温血動物の免疫活性の増強、調節等が達成でき、
- ② 増殖因子を軟骨特異的に発現させることによって、例えば、非ヒト温血動物の軟骨組織の保護等が達成できる。

20 以下に、配列番号：6、配列番号：12または配列番号：47で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドをコードする遺伝子のプロモーター領域の下流(3'末端側)に目的タンパク質(任意の有用遺伝子産物等)をコードするDNAまたはRNAを連結し、非ヒト動物に導入することによる目的タンパク質(任意の有用遺伝子産物等)を非ヒト温血動物の軟骨特異的に発現させる方法についてより具体的に記載する。

まず、配列番号：6、配列番号：12または配列番号：47で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドをコードする遺伝子のプロモーターは、コロニーハイブリダイゼーション、マークハイブリダイゼーシ

5 ョンやPCR等の自体公知の方法（例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法等）によって得ることができる。また、プロモーター活性を有する領域の同定は、レポーター・アッセイ等の自体公知の方法（例えば、アナリティカルバイオケミストリー（Analytical Biochemistry），188巻，245頁（1990年）に記載の方法等）によって得ができる。

10 次に上記の方法によって得られるプロモーターの下流（3'末端側）に目的タンパク質（任意の有用遺伝子産物等）を連結するためには、T4DNAリガーゼを用いてプラスミドを構築するための自体公知の方法（例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法等）によって目的を達成する事が出来る。

15 プロモーターの下流（3'末端側）に目的タンパク質（任意の有用遺伝子産物等）をコードするDNAを連結したものを非ヒト温血動物に導入するためには、エレクトロポーレイションを用いる方法、遺伝子錆を用いる方法、レトロウイルスベクターを用いる方法（例えば、ブラッドセルズ（Blood Cells），17巻，407頁（1991年）に記載の方法等）、アデノウイルスベクターを用いる方法（例えば、パソロジー（Pathology），30巻，335頁（1998年）に記載の方法等）等がある。

20

25 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

c DNA : 相補的デオキシリボ核酸

A : アデニン

| | | |
|----|---------|-----------------|
| | T | : チミン |
| | G | : グアニン |
| | C | : シトシン |
| | R N A | : リボ核酸 |
| 5 | m R N A | : メッセンジャー リボ核酸 |
| | d A T P | : デオキシアデノシン三リン酸 |
| | d T T P | : デオキシチミジン三リン酸 |
| | d G T P | : デオキシグアノシン三リン酸 |
| | d C T P | : デオキシシチジン三リン酸 |
| 10 | A T P | : アデノシン三リン酸 |
| | E D T A | : エチレンジアミン四酢酸 |
| | S D S | : ドデシル硫酸ナトリウム |
| | G l y | : グリシン |
| | A l a | : アラニン |
| 15 | V a l | : バリン |
| | L e u | : ロイシン |
| | I l e | : イソロイシン |
| | S e r | : セリン |
| | T h r | : スレオニン |
| 20 | C y s | : システイン |
| | M e t | : メチオニン |
| | G l u | : グルタミン酸 |
| | A s p | : アスパラギン酸 |
| | L y s | : リジン |
| 25 | A r g | : アルギニン |
| | H i s | : ヒスチジン |
| | P h e | : フェニルアラニン |
| | T y r | : チロシン |

| | |
|-----------|------------|
| T r p | : トリプトファン |
| P r o | : プロリン |
| A s n | : アスパラギン |
| G l n | : グルタミン |
| 5 p G l u | : ピログルタミン酸 |

また、本明細書中で頻用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

| | |
|------------------------|--|
| M e | : メチル基 |
| E t | : エチル基 |
| 10 B u | : プチル基 |
| P h | : フェニル基 |
| T C | : チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基 |
| T o s | : p-トルエンスルフォニル |
| C H O | : ホルミル |
| 15 B z l | : ベンジル |
| C I ₂ -Bz l | : 2, 6-ジクロロベンジル |
| B o m | : ベンジルオキシメチル |
| Z | : ベンジルオキシカルボニル |
| C I-Z | : 2-クロロベンジルオキシカルボニル |
| 20 B r-Z | : 2-プロモベンジルオキシカルボニル |
| B o c | : t-ブトキシカルボニル |
| D N P | : ジニトロフェニル |
| T r t | : トリチル |
| B u m | : t-ブトキシメチル |
| 25 F m o c | : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル |
| H O B t | : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール |
| H O O B t | : 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1, 2, 3-ベンゾトリアジン |

HONB : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシミド

DCC : N, N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号：1]

5 実施例1で用いられたアンチセンス鎖プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：2]

実施例1で用いられたセンス鎖プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：4]

配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するヒトMLP前駆体をコードする
10 DNAの塩基配列を示す。

[配列番号：5]

配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するヒトMLP前駆体に含まれるシ
グナル配列のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：6]

15 ヒトMLP前駆体のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：7]

実施例2で用いられたアンチセンス鎖プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：8]

実施例2で用いられたセンス鎖プライマーの塩基配列を示す。

20 [配列番号：10]

配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有するマウスMLP前駆体をコード
するDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：11]

配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有するマウスMLP前駆体に含まれ

25 るシグナル配列のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：12]

マウスMLP前駆体のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：13]

実施例3で用いられたG 3 P D H特異的オリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：14]

実施例3で用いられたG 3 P D H特異的オリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：15]

5 実施例3で用いられたアグリカン特異的オリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：16]

実施例3で用いられたアグリカン特異的オリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：17]

実施例3で用いられたII型コラーゲン特異的オリゴDNAの塩基配列を示す。

10 [配列番号：18]

実施例3で用いられたII型コラーゲン特異的オリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：19]

実施例3で用いられたX型コラーゲン特異的オリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：20]

15 実施例3で用いられたX型コラーゲン特異的オリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：21]

実施例3で用いられたマウスMLP特異的オリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：22]

実施例3で用いられたマウスMLP特異的オリゴDNAの塩基配列を示す。

20 [配列番号：23]

配列番号：24で表されるアミノ酸配列を有するヒトMLPをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：24]

ヒトMLPのアミノ酸配列を示す。

25 [配列番号：25]

配列番号：26で表されるアミノ酸配列を有するマウスMLPをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：26]

マウスMLPのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：27]

実施例4および実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：28]

5 実施例4で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：29]

実施例1で得られたcDNA断片の塩基配列を示す。

[配列番号：30]

実施例2で得られたcDNA断片の塩基配列を示す。

10 [配列番号：31]

実施例6で用いられた合成ペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：32]

実施例6でPCRプライマーとして用いられたオリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：33]

15 実施例6でPCRプライマーとして用いられたオリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：34]

実施例6でPCRプライマーとして用いられたオリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：35]

実施例6でPCRプライマーとして用いられたオリゴDNAの塩基配列を示す。

20 [配列番号：36]

実施例6でPCRプライマーとして用いられたオリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：37]

実施例6でPCRプライマーとして用いられたオリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：38]

25 実施例6でPCRプライマーとして用いられたオリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：39]

実施例9で得られたDNAにコードされるラットMLP前駆体の部分アミノ酸配列を示す。

[配列番号：40]

実施例9で得られたラットMLP前駆体の一部をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：41]

5 実施例9で得られたラットMLP前駆体の一部をコードするDNAを含むDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：42]

実施例9でPCRプライマーとして用いられたオリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：43]

10 実施例9でPCRプライマーとして用いられたオリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：44]

実施例9でPCRプライマーとして用いられたオリゴDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：45]

実施例9でPCRプライマーとして用いられたオリゴDNAの塩基配列を示す。

15 [配列番号：46]

配列番号：47で表されるアミノ酸配列を有するラットMLP前駆体をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：47]

ラットMLP前駆体のアミノ酸配列を示す。

20 [配列番号：48]

配列番号：49で表されるアミノ酸配列を有するラットMLPをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：49]

ラットMLPのアミノ酸配列を示す。

25 [配列番号：50]

配列番号：47で表されるアミノ酸配列を有するラットMLP前駆体に含まれるシグナル配列のアミノ酸配列を示す。

後述の実施例 1 で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) XL10-Gold/pDRL128vH は、平成 11 年 6 月 11 日から、日本国茨城県つくば市東 1-1-3 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-6750 として、平成 11 年 6 月 25 日から、
5 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町 2-17-85 財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号 IFO 16292 として寄託されている。

後述の実施例 2 で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) XL10-Gold/pDRL128vM は、平成 11 年 6 月 9 日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-6747 として、平成 11 年 6 月 25 日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号 IFO 16293 として寄託されている。
寄託されている。

後述の実施例 9 で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) XL10-Gold/pDRL128vR は、平成 12 年 5 月 19 日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-7167 として、平成 12 年 5 月 26 日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号 IFO 16439 として寄託されている。

以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はそれらに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

実施例 1 ヒト MLP 前駆体タンパク質をコードする cDNA のクローニング

ヒト胎児脳由来 poly(A)⁺ RNA を用いて以下の要領で 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA End)、3' RACE を行うことによりヒト MLP 前駆体タンパク質をコードする cDNA のクローニングを行った。ヒト胎児脳由来 poly(A)⁺ RNA (Clontech 社) 1 μg より、制限酵素部位に続く poly(T) を持つ anchored primer と Superscript II MMLV 逆転写酵素 (Gibco BRL 社)

を用いて 1st. strand cDNA を合成後、RNA ligase（宝酒造）を用いて該 1st. strand cDNA の 3' 末端に anchored primer を付加した。次に、配列番号：1 で表されるオリゴ DNA をアンチセンス鎖プライマーとして 5' RACE を、同じく配列番号：2 で表されるオリゴ DNA をセンス鎖プライマーとして 3' RACE を行い、
5 それぞれ各プライマーを起点とする 5' 上流側の配列、3' 下流側の配列を得た。
ここで得られた各 2 本鎖 DNA の塩基配列を決定したところ、オーバーラップする共通配列が存在していたことから、両配列は同一遺伝子に由来することが判った。そこで、この 5' RACE、3' RACE で得られた各 cDNA 断片をこの共通配列部分で接合し、最終的に poly(A)⁺ 鎖を含む配列番号：29 で表される全長 923
10 塩基対 (bp) の cDNA 断片を得た。この cDNA 断片には配列番号：5 で表される 18 アミノ酸残基の典型的なシグナル配列を含む、配列番号：6 で表される 128 個のアミノ酸からなる新規なヒト MLP 前駆体タンパク質がコードされていた。
このヒト MLP 前駆体タンパク質はヒト MIA 前駆体タンパク質と相同性が最も高く、4 力所存在するシステイン残基の位置が一致していた（図 1）が、その両者間の相同性はアミノ酸レベルで 23.4% にすぎなかった。
15

本実施例で得られたヒト MLP 前駆体蛋白質をコードする DNA を保持する
プラスミド pDRL128vH を大腸菌 (*Escherichia coli*) XL10-Gold に導入して、形質転換体：大腸菌 (*Escherichia coli*) XL10-Gold/pDRL128vH を得た。

20 実施例 2 マウス MLP 前駆体タンパク質をコードする cDNA のクローニング
マウス MLP 前駆体タンパク質をコードする cDNA のクローニングは、マウス
17.5 日胎児由来 poly(A)⁺ RNA を用いて、ヒト MLP 前駆体タンパク質をコードする cDNA のクローニングの場合と同様にして、5' RACE (Rapid Amplification of cDNA End)、3' RACE を行うことにより行った。マウス 17.5
25 日胎児からグアニンチオシアネート法によって total RNA を分画後、この total RNA をオリゴ (dT) スパンカラム (ファルマシア) にかけて poly(A)⁺ RNA を調製した。このマウス 17.5 日胎児由来 poly(A)⁺ RNA 1 μg より、制限酵素部位に続く poly(T) を持つ anchored primer と Superscript II MMLV

逆転写酵素 (Gibco BRL 社)を用いて 1st. strand cDNA を合成後、RNA ligase (宝酒造) を用いて合成した 1st. strand cDNA の 3' 末端に anchored primer を付加した。5' RACE、3' RACE に用いたプライマーの配列は、実施例 1 で得られたヒト MLP 前駆体タンパク質をコードする cDNA の塩基配列をクエリー (query) にして public EST (Expressed Sequence Tag) データベースから見いだした、マウス MLP 前駆体タンパク質をコードする cDNA の 3' 側の領域を含むと考えられる唯一の EST である AA222797 の配列を基に作製した。配列番号 : 7 で表されるオリゴ DNA をアンチセンス鎖プライマーとして 5' RACE を、配列番号 : 8 で表されるオリゴ DNA をセンス鎖プライマーとして 3' RACE を行い、それぞれ各プライマーを起点とする 5' 上流側の配列、3' 下流側の配列を得た。ここで得られた各 2 本鎖 DNA の塩基配列を決定したところ、オーバーラップする共通配列が存在していたことから、両配列は同一遺伝子に由来することが判った。そこで、この 5' RACE、3' RACE で得られた各 cDNA 断片をこの共通配列部分で接合し、最終的に poly(A)⁺ 鎖を含む全長 947 bp の cDNA 断片を得た (配列番号 : 30)。この cDNA 断片にはヒト MLP 前駆体タンパク質と同様に、配列番号 : 11 で示される 18 アミノ酸残基の典型的なシグナル配列を含む、配列番号 : 12 で示される 128 個のアミノ酸からなる新規マウス MLP 前駆体タンパク質がコードされていた。このマウス MLP 前駆体タンパク質は、ヒトおよびマウスの MIA 前駆体タンパク質、またヒト MLP 前駆体タンパク質で 4 力所存在するシステイン残基の位置がすべて一致していた (図 1)。また、マウス MLP 前駆体タンパク質とヒト MLP 前駆体タンパク質とのアミノ酸レベルでの相同性は 84.3% に達したが、マウス MIA 前駆体タンパク質とマウス MLP 前駆体タンパク質との相同性は 22.6% にとどまった。

本実施例で得られたマウス MLP 前駆体蛋白質をコードする DNA を保持するプラスミド pDRL128vM を大腸菌 (Escherichia coli) XL10-Gold に導入して、形質転換体 : 大腸菌 (Escherichia coli) XL10-Gold/pDRL128vM を得た。

実施例 3 in vitro 軟骨分化モデルにおける MLP の発現

マウス胚性腫瘍由来細胞株 ATDC5 は、前駆軟骨細胞の性質を極めてよく保持し、またインスリン存在下の培養で高率に軟骨分化が誘導され、その後骨形成においてみられる軟骨分化の全ての段階をシミュレーションすることができる

ことから、*in vitro* 軟骨分化モデルとして用いられている。(Cell Diff. Dev.,

5 30:109-116, 1990, J. Cell Biol., 133:457-468, 1996, J. Bone Min. Res.,
10:S234, 1995)。そこで、以下の要領で RT-PCR 法を行うことで各分化段階での
各種遺伝子の発現変化を調べた。まず、分化モデル培養系の各ステージの ATDC5
細胞から、同細胞をフェノールとチオシアニ酸グアニジンを含む均一な液体
ISOGEN (ニッポンジーン) に溶解し、クロロホルムを加えて遠心分離すること
により RNA を含む水相画分を採取し、さらにイソプロパノールを加えて攪拌後
再び遠心し沈殿させることにより精製 total RNA を取得した。次に TAKARA RNA
PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 (宝酒造) 中の AMV Reverse Transcriptase XL と Random
9 mers を用いて各被検 total RNA を逆転写して cDNA を得、次にそれらを鑄型
DNA として用い、またハウスキーピング遺伝子として G3PDH (グリセルアルデヒ
ド-3-リン酸脱水素酵素) 特異的オリゴ DNA (配列番号 : 13, 配列番号 : 14) 、
或いは軟骨分化マーカー遺伝子特異的オリゴ DNA (アグリカン (配列番号 : 15,
配列番号 : 16) 、 II 型コラーゲン (配列番号 : 17, 配列番号 : 18) 、 X 型コラ
ーゲン (配列番号 : 19, 配列番号 : 20)) をプライマー-DNA として用い、TaKaRa
Ex TaqTM (宝酒造) の反応系で PCR 反応を行った。得られた反応産物をアガロ
20 ースゲル電気泳動で分離し、その生成量を比較した。その結果、各遺伝子につ
いてそれぞれ軟骨細胞の分化段階に対応した表 1 のような発現パターンを検出
することことができた。そこで同 cDNA サンプル群に対してマウス ML P 前駆体タン
パク質をコードする cDNA に特異的なオリゴ DNA (配列番号 : 21、配列番号 : 22)
をプライマー-DNA として用いて、それ以外は全く同一反応条件で RT-PCR を行つ
25 たところ、ステージ 2 からステージ 4 にかけてマウス ML P 前駆体 mRNA 量の顯
著な亢進が認められた。このことから ML P 前駆体の遺伝子は軟骨分化の初期
段階に発現が増加する遺伝子であることがわかった。

表1

| STAGE | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| MLP | + | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | + |
| Aggrecan | + | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ |
| TypeII collagen | + | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ |
| TypeX collagen | + | + | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| G3PDH | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |

(表中の+の数は、各分化ステージでの各々の遺伝子の発現量の差異を表し、その数が多いほど発現量が多いことを示す。)

5 実施例4 COS7 細胞におけるマウス MLP-FLAG 融合タンパク質の発現とその検出

MLPが分泌タンパク質であることを確かめるため、マウス MLPについて、以下の要領で COS7 細胞におけるマウス MLP-FLAG 融合タンパク質の発現とその検出を行った。まず実施例 2 で得たマウス MLP 前駆体ポリペプチドをコードする cDNA の塩基配列に基づき、2種のプライマー-DNA を化学合成した。一つは 5'-CGAATTCCCACCATGGCAAGGATATTGATTCTTGCTTG-3' (配列番号: 27) であり、これは制限酵素 EcoRI 認識部位を含むアンカー配列を 5' 末端側に持つ +1 ~+28 (翻訳開始部位を +1 とする) までのセンス配列を含むオリゴ DNA である。もう一つは 5'-GTACAGTCGACTTCACAGAAGTCAATATCCGTGGTTG-3' (配列番号: 28) であり、これは制限酵素 SalI 認識部位を含むアンカー配列の 3' 側に +355 ~ +378 までのアンチセンス配列がつながった配列を有するオリゴ DNA である。実施例 2 で得たプラスミド pDRL128vM を鋳型としてこれら 2種のプライマー-DNA および TaKaRa LA Taq™ (宝酒造) を用い、サーマルサイクラー GeneAmp™ PCR system 9700 (パーキンエルマー社) にて、最初 98°C で 30 秒間置いた後、98°C で 10 秒、55°C で 20 秒、72°C で 2 分を 1 反応サイクルとして 25 サイクル増幅反応を繰返し、最後に 72°C で 5 分間伸長反応を行った。得られた DNA 断片を精製後、制限酵素 EcoRI と SalI で末端消化の後再精製し、動物細胞用発現ベクター pCAN618FLAG の EcoRI、SalI 部位へ挿入、連結した。pCAN618FLAG は、プラスミ

ドベクターpCAN618に由来し、選択マーカーとしてのネオマイシン耐性遺伝子を持つと共に、目的タンパク質をコードするDNA断片をそのクローニング部位であるEcoRI、SalI部位に挿入することでサイトメガロウイルスの極初期遺伝子エンハンサーとその下流のβ-アクチングリコナーゼ制御下で該タンパク質を発現させることができるものならず、SalI部位直後に存在する8アミノ酸のFLAGエピトープ配列(Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys)をコードする塩基配列と終止コドンに読み取り枠を合わせることで該目的タンパク質をFLAG融合タンパク質として発現させることも可能である。上述のPCRクローニングDNA断片のpCAN618FLAGへの挿入もマウスMLP前駆体全長とFLAGエピトープの融合タンパク質（間にValを1残基挿む）を発現する目的で行い、その結果、発現ベクタープラスミドpMMLP-Fを得た。

次にCOS7細胞 1.2×10^5 細胞を6穴プレートを用いて、10%牛胎児血清(FBS)を含むダルベッコ変法最小培地(DMEM)で24時間培養し、この細胞に上記の発現プラスミドpMMLP-F(1ウェルあたり0.4μg)をリポフェクトアミン(Gibco BRL)を用いて導入した。導入24時間後上記の新しい培地に交換し、さらに5時間後にFBS不含有Opti-MEM(Gibco BRL)に換えて36時間培養後、その培養上清と細胞抽出液を得た。細胞抽出液は細胞を生理食塩を含むリン酸緩衝液(PBS)で2回洗浄後、トリスSDSサンプル緩衝液で溶解抽出し、一方、培養上清は限外濾過(分子量3000カット)で適宜濃縮後、等容のトリスSDSサンプル緩衝液と混合した。これらのサンプルを熱処理後15%-25%SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、さらにそのゲルからPVDF膜上(Amersham pharmacia biotech社)に転写した。次に該PVDF膜をブロックエース(雪印乳業)で1時間ブロッキングし、0.05%Tween 20を含むPBS(PBS-T)中で抗FLAGモノクローナル抗体(10μg/ml; Kodak社)と2時間反応させた。PBS-Tで3回洗浄後、PBS-T中で、西洋ワサビ過酸化酵素標識抗マウスIgGヤギ抗体(Amersham pharmacia biotech社; 5000倍希釀)と1時間反応した。PBS-Tで5回洗浄後、ECLplus発色キット(Amersham pharmacia biotech社)お

および ECL film (Amersham pharmacia biotech 社) を用いて化学発光を検出した。その結果、細胞抽出液と共に培養上清中にも約 14 kDa の遺伝子産物が検出されたことから、COS7 細胞においてマウス MLP-FLAG 融合タンパク質が発現し、分泌されていることが明らかとなった。

そこで、次に該マウス MLP-FLAG 融合タンパク質の N 末端アミノ酸配列の決定を行った。まず、上述の方法に準じて発現させたマウス MLP-FLAG を含む COS7 細胞培養上清から、Anti-FLAG™ M2-Agarose Affinity Gel (Sigma 社) を用いたアフィニティクロマトグラフィーで酸性溶出画分 (Glycine-HCl バッファー (pH3.5) で溶出) を取得した。該画分を濃縮した後、本実施例既述同様の SDS-10 ポリアクリルアミドゲル電気泳動、続いて CBB 染色を行ったところ、目的タンパク質であるマウス MLP-FLAG に相当する単一のバンドのみが観察された。そこで同画分の濃縮試料を同様に電気泳動し、そのゲルから該タンパク質を PVDF 膜上に転写した後、パルスリキッドアミノ酸シーケンサー Procise CLC491 (PE バイオシステムズ社製) にかけ、N 末端アミノ酸配列を決定した。その結果、15 N 末端から順に 1. ヒスチジン、2. グリシン、3. バリン、4. フェニルアラニンの各アミノ酸残基が検出され、配列番号：26 で表されるマウス MLP の N 末端配列に一致した。以上の結果から、マウス MLP-FLAG タンパク質はマウス MLP-FLAG 前駆体タンパク質の N 末端の 18 アミノ酸残基のシグナル配列が切断され、19 残基目のヒスチジン残基から始まるマウス MLP-FLAG 成熟タンパク質として COS7 細胞より培地中に分泌されることがわかった。

実施例 5 マウス MLP-FLAG 融合タンパク質発現 CHO-K1 細胞株の樹立

以下の要領でマウス MLP-FLAG 融合タンパク質発現 CHO-K1 細胞株を樹立した。CHO-K1 細胞 3.3×10^4 細胞を、10cm 径プラスチックシャーレ上、10%牛胎児血清 (FBS) を含む F-12 培地 (Gibco BRL 社) で 24 時間培養し、これらの細胞に、実施例 4 で得られた発現プラスミド pMMLP-F (1 シャーレあたり 1.5 μ g) をリン酸カルシウム法 (CellPfect Transfection Kit (Amersham Pharmacia Biotech 社)) を用いて導入した。導入 12 時間後、細胞を FBS を含

まない F-12 培地で 2 回洗浄後、15%グリセロールを含む等張 HEPES 溶液(pH 7.5) 3ml を用いて 3 分間グリセロールショックを与えた。その後再び FBS を含まない F-12 培地で 2 回洗浄し、FBS を含む F-12 培地でさらに 12 時間培養後に 500mg / L Geneticin(Gibco BRL 社) と 10% FBS を含む F-12 選択培地（以下、選択培地）に交換した。10 日後、シャーレ中で形成された Geneticin 耐性のコロニーをそれぞれ 24 穴プレートに移し、選択培地で 3 日間培養した。次に選択培地中で増殖した細胞を 6 穴プレートに移し、さらに選択培地で 4 日間培養した後、0.02% CHAPS、0.1mM p -ABSF (和光純薬工業（株）) を含む Opti-MEM(Gibco BRL 社) 培地 1ml に交換し、さらに 48 時間培養後、その培養上清を回収した。得られた培養上清は、Centricon YM-3 限外濾過膜 (Amicon 社) を用いて濃縮後、等容のトリス SDS サンプル緩衝液と混合した。このサンプルを 95℃、5 分間熱処理をおこなった後、18% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、さらにそのゲルから泳動タンパク質をナイロン膜上に転写した。次に該ナイロン膜をブロックエース（雪印乳業（株））で 1 時間ブロッキングし、0.05% Tween20 を含む PBS (PBS-T) 中で抗 FLAG 抗体（1 / 2000 希釀、SIGMA）と 1 時間反応させた。PBS-T で 5 回洗浄後、PBS-T 中で HRP 標識抗マウス IgG ヒツジ抗体（1 / 2000 希釀、Amersham Pharmacia Biotech 社）と 1 時間反応した。PBS-T で 5 回洗浄後、ECL 発色キット (Amersham Pharmacia Biotech 社) および、Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech 社) を用いて化学発光を検出した。その結果、CHO-K1/mMLP. FLAG#2-1 株由来の細胞培養上清中におよそ 16kDa の目的遺伝子産物が最も多く検出されたことから、該細胞株をマウス MLP-FLAG 融合タンパク質発現 CHO-K1 細胞株として選択した。

実施例 6 MLP 抗血清の作製と該抗血清を用いた組換え MLP 蛋白質の検出

25 抗 MLP 抗血清は以下の要領で作製した。まず、マウス MLP 前駆体蛋白質の 105 残基目のバリンから 124 残基目のアスパラギン酸までのアミノ酸配列に対応するペプチド鎖の C 末端にさらにシステイン 1 個が付加された配列番号： 31 で表される合成ペプチド (Val-Lys-Glu-Gln-Arg-Val-Tyr-Gln-Glu-Ala-Thr-Lys-

Glu-Ile-Pro-Thr-Thr-Asp-Ile-Asp-Cys) を公知の方法により化学合成した。このペプチドにキャリアとして KLH (keyhole limpet hemocyanin) を結合したものを抗原とし、ウサギ(SPF Japanese White Rabbit)に免疫した。計 7 回の免疫を行った後、全採血を行い、公知の方法により血清画分を取得し、保存剤としてアジ化ナトリウム (最終濃度 0.1%) を添加後、該標品を抗 MLP 抗血清とした。

次に該抗血清の各種組換えタンパク質に対する反応性をウエスタンプロット解析によって調べた。まず、実施例 4 に記載したマウス MLP-FLAG 融合タンパク質に加え、マウス MLP タンパク質 (FLAG タグなし) 、ヒト MLP-FLAG 融合タンパク質、ヒト MLP タンパク質 (FLAG タグなし) 、マウス MIA-FLAG 融合タンパク質、マウス MIA タンパク質 (FLAG タグなし) の各発現ベクタープラスミドを構築した。構築は実施例 4 同様、pCAN618FLAG のクローニング部位である EcoRI 、 SalI 部位に予め PCR クローニングした目的 DNA 断片を挿入することで行った。各 PCR 反応に用いたプライマー-DNA セットの各塩基配列は、マウス MLP タンパク質 (FLAG タグなし) については配列番号: 27 と配列番号: 32 、ヒト MLP-FLAG 融合タンパク質については配列番号: 33 と配列番号: 34 、ヒト MLP タンパク質 (FLAG タグなし) については配列番号: 33 と配列番号: 35 、マウス MIA-FLAG 融合タンパク質については配列番号: 36 と配列番号: 37 、マウス MIA タンパク質 (FLAG タグなし) については配列番号: 36 と配列番号: 38 で表わされる塩基配列である。また鑄型 DNA としては、マウス MLP タンパク質 (FLAG タグなし) は実施例 4 と同様に pDRL128vM を、ヒト MLP-FLAG 融合タンパク質とヒト MLP タンパク質 (FLAG タグなし) は実施例 1 で得られた pDRL128vH を、またマウス MIA-FLAG 融合タンパク質とマウス MIA タンパク質 (FLAG タグなし) はマウスマラノーマ細胞株 B16 より調製した cDNA を用いた。このようにして得られた各発現ベクタープラスミドの COS-7 細胞への導入、また取得された各培養上清についての抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンプロット解析は実施例 4 の方法に準拠して行った。また、抗 MLP 抗血清を用いたウエスタンプロット解析は、1 次抗体として該抗血清 (1000 倍希釈) を、2 次抗体として西洋ワサビ過酸化酵素標識抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham pharmacia biotech 社; 5000

倍希釈)を用いる以外は抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンプロット解析時 の方法に準拠して行った。

図 2 に抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンプロット解析、図 3 に抗 MLP 抗血清を用いたウエスタンプロット解析の結果を示す。抗 MLP 抗血清は、抗原ペプチドの由来タンパク質であるマウス MLP とともにヒト MLP に対しても交差性を示し、その反応性はほとんど変わらなかった。また、マウス MLP-FLAG 融合タンパク質、ヒト MLP-FLAG 融合タンパク質も該抗血清に反応したことから、FLAG タグの存在にも影響されなかった。一方、マウス MIA-FLAG 融合タンパク質とマウス MIA タンパク質 (FLAG タグなし) については全くシグナルが検出されなかつたこと 10 から、該抗血清が MLP 分子種に特異的であることが判った。

さらに、該抗血清を用いて実施例 5 で取得されたマウス MLP-FLAG 発現 CHO 細胞株に対し公知の方法に準じて免疫染色を行った結果を図 4 に示す。免疫前ウサギ血清を用いた対照実験では各細胞は染色されていないが、該抗血清使用時にはすべての細胞が染色されたことから、該抗血清は未変性の MLP タンパク質とも反応することが明らかとなつた。

実施例 7 軟骨組織中の MLP タンパク質の発現

実施例 6 で得られた抗 MLP 抗血清を用いて軟骨組織中の MLP タンパク質の検出を試みた。被検試料としては、マウス (BALB/c) 大腿骨骨頭軟骨を液体窒素で凍結破碎し、TRIS SDS β ME SAMPLE BUFFER (第一化学薬品) で抽出後、遠心して残渣を除去したものを用いた。1 レーンあたりマウス 1 四分由来相当量の試料を SDS-PAGE (15-25%) で電気泳動の後、実施例 6 と同様の方法で抗 MLP 抗血清によるウエスタンプロット解析を行つた。その結果、マウス MLP 組換えタンパク質とほぼ同じ泳動位置にシグナルが検出されたことから、MLP タンパク質が該軟骨組織中で発現していることが明らかとなつた。

また、軟骨組織以外の各種ヒト組織でのヒト MLP mRNA の発現を調べるために、実施例 1 で得られたヒト MLP 前駆体タンパク質をコードする DNA 断片と [$\alpha - ^{32}$ P] d C T P (Amersham pharmacia biotech社 : 6000 Ci/mmol) を用いて、

Multiprime DNA labelling system (Amersham pharmacia biotech社:RPN. 1601Y) の方法でプローブを作製し、該プローブ（比活性 1.3×10^{10} cpm/ μg ）を用いて、Human MTE™ Array (CLONTECH社: #7775-1) に対してハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイズの条件は該アレイ膜添付のマニュアルに従い、最終的な洗浄は $0.1 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS 55°Cで行い、検出はBAS-2000（フジフィルム）を用いて行った。その結果、該アレイ上でシグナルが得られたのは、コントロールのヒト染色体DNA (100ng、500ng)とともにわずかに黒質、胎児脳のスポットであったが、いずれのシグナルも検出限界付近であり、その発現量は転写段階で極めて低いと判断された。よって、MLPタンパク質は軟骨組織で特異的に発現していることが強く示唆された。

実施例8 *in vitro* 軟骨分化モデルにおける各種遺伝子発現変動に対する MLP 組換えタンパク質の添加効果

実施例3記載のATDC5細胞を用いた *in vitro* 軟骨分化モデルにおいて、各種遺伝子発現変動に対する MLP 組換えタンパク質の添加効果を調べた。MLP 組換えタンパク質は、実施例4と同様に、マウス MLP-FLAG 融合タンパク質を発現させた COS-7 細胞培養上清より抗 FLAG 抗体によるアフィニティカラムクロマトグラフィーを公知の方法で行い、精製濃縮された標品を用いた。該タンパク質をモデル系設定初日より ATDC5 細胞に 2 日おきに添加し、10 日間培養後細胞を回収して、実施例3同様の RT-PCR 法により各遺伝子発現を調べた。その結果、該タンパク質添加細胞群では、アグリカン、II型コラーゲン、X型コラーゲン等、分化に伴って発現量が増加する各マーカー遺伝子の発現抑制が認められた。一方、軟骨への分化に抑制的に働いている PTH/PTHr 受容体発現にはその変動に有意な影響は見られなかった。このことから、MLP タンパク質は ATDC5 を用いた本モデル系において軟骨分化に抑制的に作用することが判った。

実施例9 ラット MLP 前駆体タンパク質(rMLP)をコードする遺伝子の解析

まず、rMLP の一部をコードする DNA 断片を以下のような PCR 法により取得し

た。すなわち、配列番号：21で示されるオリゴDNAをセンス鎖プライマーとして、配列番号：22で示されるオリゴDNAをアンチセンス鎖プライマーとして各々4 pmol含み、さらに10 x AdvantageTM 2 PCR Buffer（クロントック社）2 μl、50 x dNTP mix（クロントック社）0.4 μl、50 x Advantage 2 Polymerase Mix（クロントック社）0.4 μl、錆型DNAとしてSD(IGS)ラット下垂体由来のcDNA溶液2 μlを含む混合液20 μlを調製し、サーマルサイクラー（GeneAmpTM PCR system model 9700（パーキンエルマー社））を用いて95℃、1分、続いて95℃、10秒→54℃、10秒→72℃、1分を35サイクル繰り返し、さらに72℃、3分で伸長反応させるプログラムでPCR反応を行った。反応終了液を2.0%アガロースゲルを用いて電気泳動後、そのゲルをSYBRTM Green I nucleic acid gel stain（モレキュラープローブ社）で染色したところ、分子量マーカー換算で300bp付近の位置にPCR反応で増幅されたDNAに対応するバンドを確認した。キアクイックゲルエキストラクションキット（キアゲン社）を用いて該DNA断片を回収し、塩基配列を決定する為にpCRTM 2.1-Topo（インビトロジェン社）を用いてTAクローニングし、該プラスミドを大腸菌（Escherichia coli）Epicurian Coli XL10-GoldTM株（ストラタジーン社）のコンピテントセルに導入した。アンピシリン含有LB寒天培地上で出現するアンピシリン耐性形質転換株のコロニーの中から、外来DNA断片が挿入されていたプラスミドを保持していたクローンを選択し、同クローンから該プラスミドDNA、pDRL128vRを調製した。挿入DNAの塩基配列を決定するため、pDRL128vRを錆型DNA、市販プライマーDNA（Bca BEST Primer RV-P（宝酒造（株））をシーケンスプライマーとし、ABI PRISMTM BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（パーキンエルマー社）を用いたシーケンス反応を添付資料の条件にしたがって、サーマルサイクラー（GeneAmpTM PCR system model 9700（パーキンエルマー社））で行った後、該反応試料をDNAシーケンサーABI PRISMTM 377（パーキンエルマー社）で分析した。

その結果、pDRL128vRには、配列番号：39で示される87個のアミノ酸か

らなる新規ラット MLP 前駆体タンパク質の一部をコードする配列番号：4 0 で示される 261 塩基対の DNA 断片を含む、配列番号：4 1 で示される 307 塩基対の DNA 断片が含まれていた。

次に、該タンパク質をコードする遺伝子について、上記塩基配列よりさらに 5' 上流側及び 3' 下流側の構造を調べるために、genome walking を行った。被検材料として Rat GenomeWalker™ Kit (クロンテック社) を用い、方法は PCR 反応用の酵素として TaKaRa Ex Taq™ (宝酒造) を用いた点を除いては同キットの添付資料に従った。まず、gene specific primer として、配列番号：4 0 で示される塩基配列の一部にあたる 2 種のオリゴ DNA (rMLPGWF1(配列番号：4 2)、rMLPGWF2(配列番号：4 3)) と該配列の一部に相補的な配列の 2 種のオリゴ DNA (rMLPGWR1(配列番号：4 4)、rMLPGWR2(配列番号：4 5)) をそれぞれ化学合成した。これらは、3' 下流側 DNA 取得の為の 1st PCR 反応では rMLPGWF1、続く nested PCR 反応では rMLPGWF2 を用い、また 5' 上流側 DNA 取得の為の 1st PCR 反応では rMLPGWR1、続く nested PCR 反応では rMLPGWR2 を用いた。これらの反応によって得られた各増幅 DNA 断片について、上記プライマー配列部位を起点としてヒト及びマウス MLP 前駆体タンパク質をコードする cDNA の塩基配列との相同性を比較しながら各々の塩基配列を解析した。その結果、判明したゲノムの一次構造から、ラット MLP 前駆体タンパク質は、配列番号：4 6 で示される 384 塩基の DNA でコードされる配列番号：4 7 で示される 128 個のアミノ酸残基からなるタンパク質であることが明らかとなった。ラット MLP 前駆体タンパク質とヒト MLP 前駆体タンパク質及びマウス MLP 前駆体タンパク質とのアミノ酸レベルでの相同性は それぞれ 84.3%、96.0% に達したが、ラット MIA 前駆体タンパク質とラット MLP 前駆体タンパク質との相同性は 26.5% にとどまった。ラット MLP は、配列番号 4 8 : で示される 330 塩基の DNA でコードされる配列番号：4 9 で示される 110 個のアミノ酸残基からなるタンパク質であり、ラット MLP 前駆体タンパク質から配列番号：5 0 で表される、マウス MLP と同様 18 アミノ酸残基からなるシグナルペプチドがプロセスされて生成されるものと考えられる。

本実施例で得られたラット MLP 前駆体タンパク質の一部をコードする DNA を保持するプラスミド pDRL128vR を大腸菌 (*Escherichia coli*) XL10-Gold に導入して、形質転換体：大腸菌 (*Escherichia coli*) XL10-Gold / pDRL128vR を得た。

5

産業上の利用可能性

本発明のポリペプチドおよびそれをコードするDNAは、例えば、骨・関節疾患、病的血管新生の診断、治療、予防などに使用することができる。また、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。さらに、本発明のポリペプチドに対する抗体は、本発明のポリペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドの検出、定量、中和等に使用することができる。

さらに本発明のプロモーターを使用することにより、タンパク質（任意の有用遺伝子産物等）を非ヒト温血動物の軟骨で優位に（好ましくは特異的に）しかも大量に発現させることができるので、遺伝子治療の分野に貢献することができる。

請求の範囲

1. 配列番号：24で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチド、そのアミド、もしくは
5 そのエステルまたはその塩。
2. 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする請求項1記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩。
3. 配列番号：24で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、
10 配列番号：26で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩。
4. 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、
配列番号：12で表されるアミノ酸配列である請求項2記載のポリペプチド、
そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩。
- 15 5. 配列番号：24で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、
配列番号：49で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のポリペプチド、
そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩。
6. 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、
配列番号：47で表されるアミノ酸配列である請求項2記載のポリペプチド、
20 そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩。
7. 請求項1記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。
8. 請求項1記載のポリペプチドをコードする塩基配列が配列番号：23で表される塩基配列である請求項6記載のDNA。
- 25 9. 請求項1記載のポリペプチドをコードする塩基配列が配列番号：4で表される塩基配列である請求項6記載のDNA。
10. 請求項1記載のポリペプチドをコードする塩基配列が配列番号：25で表される塩基配列である請求項6記載のDNA。

11. 請求項1記載のポリペプチドをコードする塩基配列が配列番号：10で表される塩基配列である請求項6記載のDNA。
12. 請求項1記載のポリペプチドをコードする塩基配列が配列番号：48で表される塩基配列である請求項6記載のDNA。
- 5 13. 請求項1記載のポリペプチドをコードする塩基配列が配列番号：46で表される塩基配列である請求項6記載のDNA。
14. 請求項6記載のDNAを含有する組換えベクター。
15. 請求項14記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
16. 請求項15記載の形質転換体を培養し、該ポリペプチドを生成せしめることを特徴とする請求項1記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩の製造法。
- 10 17. 請求項1記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。
18. 請求項1記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項1記載のポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
19. 請求項1記載のポリペプチドまたはその塩を含有してなる請求項1記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
- 20 20. 請求項18記載のスクリーニング方法または請求項19記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。
21. 請求項18記載のスクリーニング方法または請求項19記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項1記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。
22. 請求項1記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまた

はその塩を含有してなる医薬。

23. 請求項1記載のポリペプチド、そのアミド、もしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる骨・関節疾患または病的血管新生の予防・治療剤。

24. 請求項17記載の抗体を含有してなる診断剤。

(

(

1/4

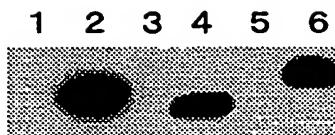
1

X

| | | | |
|------|---------------|---|---|
| hMLP | M A R I | L L F L P G L V A Y C A V H G I F - - - | M D R L A S K K L C A D D E C V Y T 40 |
| mMLP | M A R I | L L I I L L G G L V C A G H G V F - - - | M D K L S S K K L C A D E B C V Y T 40 |
| hMIA | M A R S L V | C L G V I I L L S A F S G P G V R G G P M P K L A D R K L C A D Q P C S H P 44 | C L G V I I L L S A F S G P G V R G G P M P K L A D R K L C A D Q P C S H P 44 |
| mMIA | M W S P V | - L L G I V V L - S V F S G P S R A D R A M P K L A D R K L C A D E E C S H P 43 | - L L G I V V L - S V F S G P S R A D R A M P K L A D R K L C A D E E C S H P 43 |
| rMIA | M V C S P V | - L L G I V I L - S V P S G L S R A D R A M P K L A D R K L C A D E E C S H P 43 | - L L G I V I L - S V P S G L S R A D R A M P K L A D R K L C A D E E C S H P 43 |
| DMIA | M V C S P V | - L L G I V I L - S V P S G L S R A D R A M P K L A D R K L C A D E E C S H P 43 | - L L G I V I L - S V P S G L S R A D R A M P K L A D R K L C A D E E C S H P 43 |
| hMLP | I S L A S | A Q E D Y N A P D C R F I N V K G Q Q I Y V Y S K L V K E N G A G E - F W A G 84 | I S L A R A Q E D Y N A P D C R F I D V K G Q Q I Y V Y S K L V K E N G A G E - F W A G 84 |
| mMLP | I S M A V A L | Q D Y M A P D C R F I L T I H R G Q V V V F S K L - - - | I S M A V A L Q D Y M A P D C R F I L T I H R G Q V V V F S K L - - - |
| hMIA | I S M A V A L | Q D Y V A P D C R F I L T I Y R G Q V V V F S K L - - - | I S M A V A L Q D Y V A P D C R F I L T I Y R G Q V V V F S K L - - - |
| mMIA | I S M A V A L | Q D Y V A P D C R F I L T I Y R G Q V V V F S K L - - - | I S M A V A L Q D Y V A P D C R F I L T I Y R G Q V V V F S K L - - - |
| rMIA | I S V A V A L | Q D Y V A P D C R F I L T I H Q G Q V V V F S K L - - - | I S V A V A L Q D Y V A P D C R F I L T I H Q G Q V V V F S K L - - - |
| DMIA | I S V A V A L | Q D Y V A P D C R F I L T I H Q G Q V V V F S K L - - - | I S V A V A L Q D Y V A P D C R F I L T I H Q G Q V V V F S K L - - - |
| hMLP | S V Y G D | G Q D E M G V - V G Y P P R N L V K E Q R V Y Q E A T K R V P T T D I D P F C E 128 | S V Y G D H Q D E M G I - V G Y F P S N L V K E Q R V Y Q E A T K E I P T T D I D F F C B 128 |
| mMLP | S V Y G D | S V Q G D Y Y G D L A A R L G Y F P S S I V R E D Q T L K P G K V D V K T D K W D F Y C Q 131 | S V Q G D Y Y G D L A A R L G Y F P S S I V R E D Q T L K P G K I D M K T D Q W D F Y C Q 130 |
| hMIA | S V Q G D | S V Q G D Y Y G D L A A H L G Y F P S S I V R E D L T L K P G K V D M K T D E W D F Y C Q 130 | S V Q G D Y Y G D L A A H L G Y F P S S I V R E D Q T L K P A K T D V K T D I W D F Y C Q 130 |
| mMIA | S V Q G D | S V Q G D Y Y G D L A A R L G Y F P S S I V R E D Q T L K P A K T D V K T D I W D F Y C Q 130 | S V Q G D Y Y G D L A A R L G Y F P S S I V R E D Q T L K P A K T D V K T D I W D F Y C Q 130 |
| rMIA | S V Q G D | S V Q G D Y Y G D L A A R L G Y F P S S I V R E D Q T L K P A K T D V K T D I W D F Y C Q 130 | S V Q G D Y Y G D L A A R L G Y F P S S I V R E D Q T L K P A K T D V K T D I W D F Y C Q 130 |
| DMIA | S V Q G D | S V Q G D Y Y G D L A A R L G Y F P S S I V R E D Q T L K P A K T D V K T D I W D F Y C Q 130 | S V Q G D Y Y G D L A A R L G Y F P S S I V R E D Q T L K P A K T D V K T D I W D F Y C Q 130 |

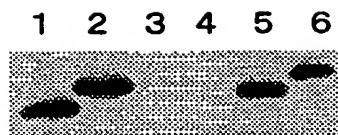
THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/4
図 2



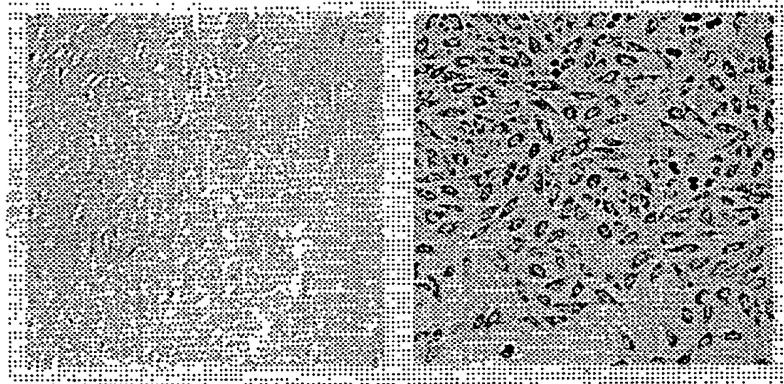
THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/4
☒ 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/4
 4



pre-immune

anti-MLP

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1/19

SEQUENCE LISTINGS

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Polypeptide and its Use

<130> 2622WOOP

<150>1999-06-30

<151>JP 11-186718

<160> 48

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 1

CGCAGAAGAA GTCAATATCC GTGGTG

26

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 2

CAGCGTGTGT ACCAGGAAGC TACCAA

26

<210> 4

<211> 384

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/19

ATGGCAAGAA TATTGTTACT TTT CCTCCCG GGTCTTGTGG CTGTATGTGC TGTGCATGGA 60
 ATATTTATGG ACCGTCTAGC TTCCAAGAAG CTCTGTGCAG ATGATGAGTG TGTCTATACT 120
 ATTTCTCTGG CTAGTGCTCA AGAAGATTAT AATGCCCGG ACTGTAGATT CATTAAACGTT 180
 AAAAAAGGGC AGCAGATCTA TGTGTACTCA AAGCTGGTAA AAGAAAATGG AGCTGGAGAA 240
 TTTTGGGCTG GCAGTGTTA TGGTGATGGC CAGGACGAGA TGGGAGTCGT GGGTTATTTC 300
 CCCAGGAAC TGGTCAAGGA ACAGCGTGTG TACCAGGAAG CTACCAAGGA AGTTCCCACC 360
 ACGGATATTG ACTTCTTCTG CGAG 384

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Met Ala Arg Ile Leu Leu Leu Phe Leu Pro Gly Leu Val Ala Val Cys

1 5 10 15

Ala Val

18

<210> 6

<211> 128

<212> PRT

<213> Human

<400> 6

Met Ala Arg Ile Leu Leu Leu Phe Leu Pro Gly Leu Val Ala Val Cys

1 5 10 15

Ala Val His Gly Ile Phe Met Asp Arg Leu Ala Ser Lys Lys Leu Cys

20 25 30

Ala Asp Asp Glu Cys Val Tyr Thr Ile Ser Leu Ala Ser Ala Gln Glu

35 40 45

Asp Tyr Asn Ala Pro Asp Cys Arg Phe Ile Asn Val Lys Lys Gly Gln

50 55 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/19

Gln Ile Tyr Val Tyr Ser Lys Leu Val Lys Glu Asn Gly Ala Gly Glu
65 70 75 80
Phe Trp Ala Gly Ser Val Tyr Gly Asp Gly Gln Asp Glu Met Gly Val
85 90 95
Val Gly Tyr Phe Pro Arg Asn Leu Val Lys Glu Gln Arg Val Tyr Gln
100 105 110
Glu Ala Thr Lys Glu Val Pro Thr Thr Asp Ile Asp Phe Phe Cys Glu
115 120 125 128

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 7

CACACAGCAC GTAGTCGCAG TTGG

24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 8

AACTTGGTGA AGGAGCAGCG TGTA

24

<210> 10

<211> 384

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/19

ATGGCAAGGA TATTGATTCT TTTGCTTGGG GGCCCTTGTGG TTCTATGTGC CGGGCATGGT 60
 GTATTTATGG ATAAACCTTC TTCTAAGAAC TTGTGTGCCG ATGAGGAGTG TGTCTATACT 120
 ATTTCTCTGG CAAGAGCACCA GGAAGATTAC AATGCCCGAG ACTGTAGGTT CATCGATGTC 180
 AAGAAAAGGGC AGCAGATCTA TGTTTACTCC AAGCTGGTAA CAGAAAACGG AGCTGGAGAG 240
 TTTTGGGCTG GCAGTGTGTTA TGGTGACCAC CAGGATGAGA TGGGAATTGT AGGTTATTTC 300
 CCCAGCAACT TGGTGAAGGA GCAGCGTGTA TACCAGGAGG CCACCAAGGA GATCCCAACC 360
 ACGGATATTG ACTTCTCTG TGAA 384

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 11

Met Ala Arg Ile Leu Ile Leu Leu Leu Gly Gly Leu Val Val Leu Cys

1 5 10 15

Ala Gly

18

<210> 12

<211> 128

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 12

Met Ala Arg Ile Leu Ile Leu Leu Leu Gly Gly Leu Val Val Leu Cys

1 5 10 15

Ala Gly His Gly Val Phe Met Asp Lys Leu Ser Ser Lys Lys Leu Cys

20 25 30

Ala Asp Glu Glu Cys Val Tyr Thr Ile Ser Leu Ala Arg Ala Gln Glu

35 40 45

Asp Tyr Asn Ala Pro Asp Cys Arg Phe Ile Asp Val Lys Lys Gly Gln

50 55 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5/19

Gln Ile Tyr Val Tyr Ser Lys Leu Val Thr Glu Asn Gly Ala Gly Glu
65 70 75 80
Phe Trp Ala Gly Ser Val Tyr Gly Asp His Gln Asp Glu Met Gly Ile
85 90 95
Val Gly Tyr Phe Pro Ser Asn Leu Val Lys Glu Gln Arg Val Tyr Gln
100 105 110

Glu Ala Thr Lys Glu Ile Pro Thr Thr Asp Ile Asp Phe Phe Cys Glu
115 120 125 128

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 13

ACCACAGTCC ATGCCATCAC 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 14

TCCACCAACCC TGTTGCTGTA 20

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/19

<223>

<400> 15

CTACCGCGTG CGCCCATCAT CAGA

24

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 16

GGGAGGCCGG TTTGGTGGG GTAGA

25

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 17

CACACTGGTA AGTGGGGCAA GACCG

25

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 18

GGATTGTGTT GTTCAGGGT TCGGG

25

<210> 19

<211> 20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7/19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 19

ACCCCCCTGGC CCCTCTGGA

20

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 20

ATCTCACCTT TAGCCCCCTGG AATG

24

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 21

GCCGGGCATG GTGTATTAT

20

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 22

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/19

GATCTCCTTG GTGGCCTCCT GGTAT

25

<210> 23

<211> 330

<212> DNA

<213> Human

<400> 23

CATGGAATAT TTATGGACCG TCTAGCTTCC AAGAAGCTCT GTGCAGATGA TGAGTGTGTC 60
TATACTATTT CTCTGGCTAG TGCTCAAGAA GATTATAATG CCCC GGACTG TAGATT CATT 120
AACGTTAAAA AAGGGCAGCA GATCTATGTG TACTCAAAGC TGGTAAAAGA AAATGGAGCT 180
GGAGAATTTT GGGCTGGCAG TGTTTATGGT GATGCCAGG ACGAGATGGG AGTCGTGGGT 240
TATTC CCCC CA GGA ACTTGGT CAAGGAACAG CGTGTGTACC AGGAAGCTAC CAAGGAAGTT 300
CCCACCA CACGG ATATTGACTT CTTCTGCGAG 330

<210> 24

<211> 110

<212> PRT

<213> Human

<400> 24

His Gly Ile Phe Met Asp Arg Leu Ala Ser Lys Lys Leu Cys Ala Asp

5

10

15

Asp Glu Cys Val Tyr Thr Ile Ser Leu Ala Ser Ala Gln Glu Asp Tyr

20

25

30

Asn Ala Pro Asp Cys Arg Phe Ile Asn Val Lys Lys Gly Gln Gln Ile

35

40

45

Tyr Val Tyr Ser Lys Leu Val Lys Glu Asn Gly Ala Gly Glu Phe Trp

50

55

60

Ala Gly Ser Val Tyr Gly Asp Gly Gln Asp Glu Met Gly Val Val Gly

65

70

75

80

Tyr Phe Pro Arg Asn Leu Val Lys Glu Gln Arg Val Tyr Gln Glu Ala

85

90

95

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9/19

Thr Lys Glu Val Pro Thr Thr Asp Ile Asp Phe Phe Cys Glu

100 105 110

<210> 25

<211> 330

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 25

CATGGTGTAT TTATGGATAA ACTTTCTTCT AAGAACGTTGT GTGCAGGATGA GGAGTGTGTC 60
TATACTATT CTCTGGCAAG AGCACAGGAA GATTACAATG CCCCAGACTG TAGGTTCATC 120
GATGTCAAGA AAGGGCAGCA GATCTATGTT TACTCCAAGC TGGTAACAGA AAACGGAGCT 180
GGAGAGTTTT GGGCTGGCAG TGTTTATGGT GACCACCAGG ATGAGATGGG AATTGTAGGT 240
TATTCCCCA GCAACTTGGT GAAGGAGCAG CGTGTATAACC AGGAGGCCAC CAAGGAGATC 300
CCAACCACGG ATATTGACTT CTTCTGTGAA 330

<210> 26

<211> 110

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 26

His Gly Val Phe Met Asp Lys Leu Ser Ser Lys Lys Leu Cys Ala Asp

5 10 15

Glu Glu Cys Val Tyr Thr Ile Ser Leu Ala Arg Ala Gln Glu Asp Tyr

20 25 30

Asn Ala Pro Asp Cys Arg Phe Ile Asp Val Lys Lys Gly Gln Gln Ile

35 40 45

Tyr Val Tyr Ser Lys Leu Val Thr Glu Asn Gly Ala Gly Glu Phe Trp

50 55 60

Ala Gly Ser Val Tyr Gly Asp His Gln Asp Glu Met Gly Ile Val Gly

65 70 75 80

Tyr Phe Pro Ser Asn Leu Val Lys Glu Gln Arg Val Tyr Gln Glu Ala

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/19

85

90

95

Thr Lys Glu Ile Pro Thr Thr Asp Ile Asp Phe Phe Cys Glu

100

105

110

<210> 27

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 27

CGAATTCCA CCATGGCAAG GATATTGATT CTTTGCTTG

40

<210> 28

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 28

GTACAGTCGA CTTCACAGAA GAAGTCAATA TCCGTGGTTG

40

<210> 29

<211> 923

<212> DNA

<213> Human

<400> 29

GTCAGAGTTC AAGTTAAAAC AGAAAAAAGG AAGATGGCAA GAATATTGTT ACTTTCCCTC 60

CCGGGTCTTG TGGCTGTATG TGCTGTGCAT GGAATATTAA TGGACCGTCT AGCTTCCAAG 120

AAGCTCTGTG CAGATGATGA GTGTGTCTAT ACTATTCTC TGGCTAGTGC TCAAGAAGAT 180

TATAATGCCCG CGGACTGTAG ATTCAATTAAAC GTTAAAAAAG GGCAGCAGAT CTATGTGTAC 240

TCAAAGCTGG TAAAAGAAAA TGGAGCTGGA GAATTTGGG CTGGCAGTGT TTATGGTGAT 300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11/19

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|-----|
| GGCCAGGACG | AGATGGGAGT | CGTGGTTAT | TTCCCAGGA | ACTTGGTCAA | GGAACAGCGT | 360 |
| GTGTACCAGG | AAGCTACCAA | GGAAGTTCCC | ACCACGGATA | TTGACTTCTT | CTGCGAGTAA | 420 |
| TAAATTAGTT | AAAACGTCAA | ATAGAAAGAA | AACACCAAAA | ATAAAGAAAA | GAGCAAAAGT | 480 |
| GGCCAAAAAA | TGCATGTCTG | TAATTTGGA | CTGACGTTT | AAGAATTGT | TACCTTACAG | 540 |
| AAGAGCAAGG | GCTTAGGGGT | TGGAGGTGGC | AGATAAAAGA | GGATTTCAA | CTCAAATCTT | 600 |
| GTTCCTGCT | GGCCTGGTCT | GCCCACGAGC | TAGAGCGGGG | AAATGTTGAG | CTCAAATGGG | 660 |
| TAAATTGAGA | CCAGAAAATT | ATTTTTCAA | CCTAGAGAAT | CTCCTCTTAC | AGGGGGATGC | 720 |
| ATATAACAGA | TCATGTATGT | GTAGTTATT | CTAAAGTAGTA | ATTCTTCCA | GCTCTTGAT | 780 |
| TTGCCATATA | TAAAATAGGT | GGGTCGTATG | TCTTCCCTT | AGACATGATG | TTTCTACTC | 840 |
| ATTTGTCTCT | CTGGCCAATT | GAATTATTAA | TAAAAGGTCT | GTATTATCAA | AGAAAAAAAAA | 900 |
| AAAAAAAAAA | AAAAAAAAAA | AAA | | | | 923 |

<210> 30

<211> 947

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 30

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| AAGAAGGAAG | ATGGCAAGGA | TATTGATTCT | TTTGCTTGGG | GGCCTTGTGG | TTCTATGTGC | 60 |
| CGGGCATGGT | GTATTTATGG | ATAAACTTTC | TTCTAAGAAG | TTGTGTGCGG | ATGAGGAGTG | 120 |
| TGTCTATACT | ATTTCTCTGG | CAAGAGCACCA | GGAAGATTAC | AATGCCCGAG | ACTGTAGGTT | 180 |
| CATCGATGTC | AAGAAAGGGC | AGCAGATCTA | TGTTTACTCC | AAGCTGGTAA | CAGAAAACGG | 240 |
| AGCTGGAGAG | TTTGGGCTG | GCAGTGTAA | TGGTGACCAC | CAGGATGAGA | TGGGAATTGT | 300 |
| AGGTTATTTC | CCCAGCAACT | TGGTGAAGGA | GCAGCGTGT | TACCAGGAGG | CCACCAAGGA | 360 |
| GATCCAACC | ACGGATATTG | ACTTCTTCTG | TGAATAAGAA | ATTAATTAAA | ACAGCAGATA | 420 |
| AAACAGAAC | ACCAAGTGTG | AAGAAGAGAA | GAAGTGGAAA | TAACTGAACC | TGTGTATCCG | 480 |
| TACCTTCCTG | GCTTTATTG | GTGGCAGGAG | GTTGGAGCTT | GAAGGTGCTA | AGATATGGAA | 540 |
| ATTGTCAACT | CAGTCTTGT | TACTCTGCC | CCGGTCTTC | CACCAACTGC | GACTAAGTGC | 600 |
| TGTGTGAATC | ATATAGGTCA | TTTATAACCC | AATACTTAGC | TTTCAGCGAG | GAGAATCTT | 660 |
| ATTTACTCAG | TGATGAACAT | ATAAGGTGTT | TTATCTGTAG | TTATTTCTAA | ATGGTCATTC | 720 |
| TCCCCAGCTC | TGACTCCATG | TCCTTAAGCT | TGCTGAGTTA | GAAGTCTGAC | TTTGGGTGT | 780 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12/19

GTTTCTGTT ATTTGTCTCT CTGGTCATGT GAAGTCTTAA TAATGTATT GTCATGATAA 840
CTTCCTATTG TTACTTTTA TATCTGATGC CCTTGGATAG AAGAATGTTA GGTATAAAAC 900
AAGTTTTGT ACTCCCAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAA 947

<210> 31

<211> 21

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 31

Val Lys Glu Gln Arg Val Tyr Gln Glu Ala Thr Lys Glu Ile Pro Thr
5 10 15

Thr Asp Ile Asp Cys

20

<210> 32

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 32

GTACAGTCGA CTTATTACA GAAGAAGTCA ATATCCGTGG T 41

<210> 33

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 33

CGAATTCCA CCATGGCAAG AATATTGTTA CTTTCCTC 39

<210> 34

THIS PAGE BLANK (USPTO)

13/19

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 34

GTACAGTCGA CCTCGCAGAA GAAGTCAATA TCCGTGGT

38

<210> 35

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 35

GTACAGTCGA CTTACTCGCA GAAGAAGTCA ATATCCGTGG T

41

<210> 36

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 36

CGAATTCCA CCATGGTGTG GTCCCCAGTG CTCCCTT

36

<210> 37

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

14/19

<400> 37

GTACAGTCGA CCTGGCAGTA GAAATCCCAT TGATCGGT 38

<210> 38

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 38

GTACAGTCGA CCTGGCAGTA GAAATCCCAT TGATCGGT 38

<210> 39

<211> 87

<212> PRT

<213> Rat

<400> 39

Asp Lys Leu Ser Ser Lys Lys Leu Cys Ala Asp Glu Glu Cys Val Tyr

5 10 15

Thr Ile Ser Leu Ala Arg Ala Gln Glu Asp Tyr Asn Ala Pro Asp Cys

20 25 30

Arg Phe Ile Asn Val Lys Lys Gly Gln Gln Ile Tyr Val Tyr Ser Lys

35 40 45

Leu Val Thr Glu Asn Gly Ala Gly Ala Phe Trp Ala Gly Ser Val Tyr

50 55 60

Gly Asp His Gln Asp Glu Met Gly Ile Val Gly Tyr Phe Pro Ser Asn

65 70 75 80

Leu Val Arg Glu Gln Arg Val

85

<210> 40

<211> 261

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15/19

<212> DNA

<213> Rat

<400> 40

GGATAAACTT TCTTCTAAGA AGTTGTGTGC AGATGAGGAG TGTGTCTATA CCATTCTCT 60
GGCAAGAGCA CAGGAAGACT ACAATGCCCC GGACTGTAGG TTCATCAATG TCAAGAAAGG 120
GCAGCAGATC TATGTTTATT CCAAGCTGGT AACAGAAAAT GGAGCTGGGG CATTCTGGGC 180
TGGCAGTGT TATGGTGACC ACCAGGATGA GATGGGAATT GTGGGTTATT TCCCCAGCAA 240
CTTGGTTAGA GAGCAACGAG T 261

<210> 41

<211> 307

<212> DNA

<213> Rat

<400> 41

GCCGGGCATG GTGTATTAT GGATAAACTT TCTTCTAAGA AGTTGTGTGC AGATGAGGAG 60
TGTGTCTATA CCATTCTCT GGCAAGAGCA CAGGAAGACT ACAATGCCCC GGACTGTAGG 120
TTCATCAATG TCAAGAAAGG GCAGCAGATC TATGTTTATT CCAAGCTGGT AACAGAAAAT 180
GGAGCTGGGG CATTCTGGGC TGGCAGTGT TATGGTGACC ACCAGGATGA GATGGGAATT 240
GTGGGTTATT TCCCCAGCAA CTTGGTTAGA GAGCAACGAG TATACCAGGA GGGCCACCAA 300

GGAGATC 307

<210> 42

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 42

CACCAAGGATG AGATGGGAAT TGTGGGTTAT

<210> 43

<211> 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

16/19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 43

GGGTTATTTC CCCAGCAACT TGGTTAGAGA

<210> 44

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 44

AGACACACTC CTCATCTGCA CACAACCTC

<210> 45

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 45

CTCCTCATCT GCACACAACT TCTTAGAAGA

<210> 46

<211> 384

<212> DNA

<213> Rat

<400> 46

ATGGCAAGAA TATTGATTCT TTTGCTTGGG GGCCTTGTGG CTCTCTGTGC CGGGCATGGC 60

ATGTTTATGG ATAAACTTTC TTCTAAGAAG TTGTGTGCAG ATGAGGGAGTG TGTCTATACC 120

THIS PAGE BLANK (USPTO)

17/19

ATTTCTCTGG CAAGAGCACA GGAAGACTAC AATGCCCGG ACTGTAGGTT CATCAATGTC 180
AAGAAAGGGC AGCAGATCTA TGTTTATTCC AAGCTGGTAA CAGAAAATGG AGCTGGGGCA 240
TTCTGGGCTG GCAGTGTAA TGGTGACCAC CAGGATGAGA TGGGAATTGT GGGTTATTTC 300
CCCAGCAACT TGGTTAGAGA GCAACGAGTG TACCAAGGAGG CCACCAAGGA GATTCCAACC 360
ACGGATATTG ACTTCTTCTG TGAA 384

<210> 47

<211> 128

<212> PRT

<213> Rat

<400> 47

Met Ala Arg Ile Leu Ile Leu Leu Leu Gly Gly Leu Val Ala Leu Cys

5 10 15

Ala Gly His Gly Met Phe Met Asp Lys Leu Ser Ser Lys Lys Leu Cys

20 25 30

Ala Asp Glu Glu Cys Val Tyr Thr Ile Ser Leu Ala Arg Ala Gln Glu

35 40 45

Asp Tyr Asn Ala Pro Asp Cys Arg Phe Ile Asn Val Lys Lys Gly Gln

50 55 60

Gln Ile Tyr Val Tyr Ser Lys Leu Val Thr Glu Asn Gly Ala Gly Ala

65 70 75 80

Phe Trp Ala Gly Ser Val Tyr Gly Asp His Gln Asp Glu Met Gly Ile

85 90 95

Val Gly Tyr Phe Pro Ser Asn Leu Val Arg Glu Gln Arg Val Tyr Gln

100 105 110

Glu Ala Thr Lys Glu Ile Pro Thr Thr Asp Ile Asp Phe Phe Cys Glu

115 120 125

<210> 48

<211> 330

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

18/19

<213> Rat

<400> 48

CATGGCATGT TTATGGATAA ACTTTCTTCT AAGAACGTTGT GTGCAGATGA GGAGTGTGTC 60
TATACCATT CTCTGGCAAG AGCACAGGAA GACTACAATG CCCCCGACTG TAGGTTCATC 120
AATGTCAAGA AAGGGCAGCA GATCTATGTT TATTCCAAGC TGGTAACAGA AAATGGAGCT 180
GGGGCATTCT GGGCTGGCAG TGTTTATGGT GACCACCAGG ATGAGATGGG AATTGTGGGT 240
TATTCCCCA GCAACTTGTT TAGAGAGCAA CGAGTGTACC AGGAGGCCAC CAAGGAGATT 300
CCAACCACGG ATATTGACTT CTTCTGTGAA 330

<210> 49

<211> 110

<212> PRT

<213> Rat

<400> 49

His Gly Met Phe Met Asp Lys Leu Ser Ser Lys Lys Leu Cys Ala Asp

5 10 15

Glu Glu Cys Val Tyr Thr Ile Ser Leu Ala Arg Ala Gln Glu Asp Tyr

20 25 30

Asn Ala Pro Asp Cys Arg Phe Ile Asn Val Lys Lys Gly Gln Gln Ile

35 40 45

Tyr Val Tyr Ser Lys Leu Val Thr Glu Asn Gly Ala Gly Ala Phe Trp

50 55 60

Ala Gly Ser Val Tyr Gly Asp His Gln Asp Glu Met Gly Ile Val Gly

65 70 75 80

Tyr Phe Pro Ser Asn Leu Val Arg Glu Gln Arg Val Tyr Gln Glu Ala

85 90 95

Thr Lys Glu Ile Pro Thr Asp Ile Asp Phe Phe Cys Glu

100 105 110

<210> 50

<211> 18

THIS PAGE BLANK (USPTO)

19/19

<212> PRT

<213> Rat

<400> 50

Met Ala Arg Ile Leu Ile Leu Leu Leu Gly Gly Leu Val Ala Leu Cys

5

10

15

Ala Gly

18

THIS PAGE BLANK (USPTO)